

# Einfluss der Epstein-Barr-Virus Proteine LMP1 und EBNA2 auf die B-Zellentwicklung *in vivo*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Cornelia Hömig

Juli 2005

## Eidesstattliche Erklärung:

Ich, Cornelia Hömig geb. in Köln, versichere hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt habe.

München, den 25.07.05

Cornelia Hömig

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: PD Dr. Christine Falk

Tage der mündlichen Prüfung: 12.12.05

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
	<b>Abkürzungen</b>	<b>V</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Die B-Zellentwicklung	1
1.3	B-Zellaktivierung	4
1.4	Der CD40-Rezeptor	5
1.5	Das Epstein-Barr-Virus	8
1.6	Lebenszyklus des Epstein-Barr-Virus	8
1.7	EBV-assoziierte Erkrankungen	10
1.8	Die latenten EBV-Proteine	12
1.8.1	Das latente Membranprotein 1 (LMP1) des Epstein-Barr-Virus	12
1.8.2	Das Epstein-Barr-Virus-kodierte Kernantigen 2 (EBNA2)	15
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>19</b>
3.1	Einfluss eines konstitutiven aktiven CD40 auf die B-Zellentwicklung <i>in vivo</i>	19
3.1.1	Generierung einer LMP1/CD40-exprimierenden Maus	19
3.1.2	Das Fusionsprotein LMP1/CD40 kann wie ein aktiver CD40-Rezeptor Klassenwechsel induzieren	22
3.1.3	Die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 in der Maus führt zu einer Zunahme der B- und T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen	24
3.1.4	Durch die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 wird die frühe B- Zellentwicklung nicht beeinflusst, jedoch die Rezirkulation der reifen B-Zellen ins Knochenmark behindert	26
3.1.5	Die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 führt zu einer Vermehrung von follikulären und Marginalzonen- B-Zellen	28
3.1.6	Die Expression von LMP1/CD40 in B-Zellen führt zu einer Reduktion der B1- Zellen in der Peritonealhöhle	32
3.1.7	Die peripheren T-Zellen zeigen in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen einen aktivierten Phänotyp	33

3.1.8	LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen zeigen einen aktivierten Phänotyp	34
3.1.9	Die LMP1/CD40-Expression in B-Zellen führt zur spontanen Proliferation und zum verlängerten Überleben der B-Zellen.	36
3.1.10	LMP1/CD40 aktiviert hauptsächlich den nicht-kanonischen NFκB-Signalwegs	40
<b>3.2</b>	<b>Einfluss eines konstitutiv aktiven CD40-Signals auf die T-Zell-abhängige Immunantwort von B-Zellen</b>	<b>42</b>
3.2.1	LMP1/CD40-exprimierende Mäuse sind nach der Immunisierung mit T-Zell-spezifischem Antigen nicht in der Lage, Keimzentren in der Milz zu bilden	42
3.2.2	Die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 hat keinen Einfluss auf die Keimzentrumsbildung in Peyerschen Plaques	43
3.2.3	LMP1/CD40-exprimierende Mäuse haben annähernd normale Antikörper Titer im Blut, sind aber nicht in der Lage nach Immunisierung spezifische Antikörper zu produzieren	44
3.2.4	LMP1/CD40-Expression kann in CD40-defizienten Mäusen keinen Klassenwechsel rekonstituieren	47
<b>3.3</b>	<b>LMP1/CD40-Expression führt zu der Entstehung von Lymphomen</b>	<b>50</b>
3.3.1	Lymphoproliferative Erkrankungen in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen	50
3.3.2	In den Milzen der erkrankten Mäuse dominiert meist eine B-Zellpopulation	53
3.3.3	Die frühe B-Zellentwicklung ist in Mäusen mit lymphoproliferativen Erkrankungen stark beeinflusst	55
3.3.4	LMP1/CD40-exprimierende Mäuse mit lymphoproliferativen Erkrankungen, haben weniger Immunglobuline im Blutserum	57
3.3.5	Die in den erkrankten Mäusen expandierte B-Zellpopulation ist monoklonal	58
3.3.6	Die follikuläre Struktur der Milz ist in erkrankten Mäusen stark verändert und zum größten Teil völlig aufgelöst	59
3.3.7	LMP1/CD40-exprimierende Mäuse entwickeln follikuläre Lymphome	60
<b>3.4</b>	<b>Einfluss von EBNA2 auf B-Zellen <i>in vivo</i></b>	<b>63</b>
3.4.1	Generierung einer EBNA2-exprimierenden Mauslinie	63
3.4.2	Generierung der transgenen Mauslinie EBNA2 <sup>f1STOPP</sup>	64
3.4.3	B-Zell-spezifische Expression von EBNA2 in der Maus	69
3.4.4	Die B-Zell-spezifische Expression von EBNA2 hat in 8-12 Wochen alten Mäusen keinen Einfluss auf die B-Zellentwicklung	70

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
4.1	Generierung des transgenen Mausstammes LMP1/CD40 <sup>fSTOPP</sup> als <i>in vivo</i> Modell für ein konstitutiv aktives CD40	76
4.2	Die Expression von LMP1/CD40 führt zu einer Reduktion der rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark	77
4.3	Ein konstitutiv aktives CD40-Signal führt zu einer Expansion und Aktivierung der peripheren B-Zellen	77
4.4	Ein konstitutives CD40 Signal blockiert die Keimzentrumsreaktion	81
4.5	Die B-Zell spezifische Expression von LMP1/CD40 führt in 12-18 Monaten alten Mäusen zur Entstehung von Lymphomen	84
4.6	Die B-Zellentwicklung in Mäusen wird durch die Expression von EBNA2 nicht beeinflusst	87
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>92</b>
6.1	<b>Material</b>	<b>92</b>
6.1.1	Chemikalien, Enzyme, Geräte und Reagenzien	92
6.1.2	Plasmide	94
6.1.3	Sonden für Southern-Blot-Analysen	95
6.1.4	Bakterien	95
6.1.5	Zelllinien	96
6.1.6	Mausstämme	96
6.1.7	EDV	97
6.2	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>97</b>
6.2.1	DNA-präparative Techniken	97
6.2.2	Techniken der DNA-Analyse	99
6.2.3	Proteintransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen	103
6.3	<b>Zellkultur</b>	<b>106</b>
6.3.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	106
6.3.2	Transfektion von ES-Zellen	109
6.3.3	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	110
6.3.4	Kultivierung primärer Lymphozyten	111
6.3.5	In vitro Proliferations-Assay	111
6.4	<b>Generierung und Analyse von transgenen Mäusen</b>	<b>112</b>

6.4.1. Erzeugung transgener Mäuse	112
6.4.2. Präparation primärer Maus Lymphozyten	112
6.4.3 Isolierung von B-Zellen aus der Maus	113
6.4.4 Immunisierung von Mäusen	113
6.4.5 Durchflusszytometrie	114
6.4.6 Immunohistochemie von Gefrierschnitten	114
6.4.7 Präparation von Blutserum aus Mäuseblut	116
6.4.8 „Enzyme linked immuno sorbent assay“ (ELISA)	116
6.4.9 Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)	117
<b>7 Literatur</b>	<b>120</b>
<b>Appendix</b>	<b>130</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
APS	Ammoniumpersulfat
BL	Burkit-Lymphom
bp	Basenpaar (e)
bpA	Bovines Polyadenylierungssignal
BCR	B-Zell-Rezeptor („B cell receptor“)
BSA	Rinder-Serum Albumin („bovine serum albumine“)
cDNA	copy-DNA
CIP	Kälberdarm-Phosphatase („calf intestine phosphatase“)
CFSE	CFDA-SE Carboxy-Fuoreszin Diacetat succinimidyl Ester
Cre-Protein	Protein Rekombinase des <i>PI</i> Phagen („Causes Recombination“)
CTAR	C-terminale Aktivierungs-Regionen
DMEM	Dulbeccos Modifikation des „Eagle“ Mediums
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EBNA	Epstein-Barr virales Kern Antigen („EBV-nuclear-antigen“)
EBER	nicht-polyadenylierte kleine RNA's des EBV
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylen-Diamin-tetra-Acetat
EF-Zellen	embryonale Fibroblastenzellen
ELISA	„Enzym linked immuno sorbent assay“
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	und andere („et alii“)
FACS	Fluoreszenz-assoziierte Durchfluss Zytometrie
FCS	fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
FDC	follikulären dendritischen Zellen
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
FL	(Flox) von lox-P-Stellen flankierter Bereich
FoB	follikuläre B-Zellen
FRT	Erkennungssequenz der Rekombinase Flip
g	Gramm
xg	x fache Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
GC	Keimzentrum („germinal center“)
HAT	Histon. Acetyltransferase
HD	Hodgkin Erkrankung („Hodgkins Disease“)
HDAC1	Histondeacetylase 1
HIGM	“X-linked-hyper-IgM syndrom”
HL	Hodgkin-Lymphom
HRS-Zellen	Hodgkin Reed Sternberg-Zellen
HRP	Meerrettich Peroxidase
HSV-tk	Thymidinkinase-Gen des <i>Herpes simplex Virus</i> Typ1
i.E.	internationale Einheiten
i.p.	intra peritoneal (Injektion in die Bauchhöhle)

## Abkürzungen

---

Ig	Immunoglobulin
IgH	Immunglobulin der schweren Kette
IgL	Immunglobulin der leichten Kette
IM	infektiöse Mononucleose
ITAM	„immunoreceptor tyrosine-based activation motif“
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun-Kinase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LA	langer Arm der Homologie („long arm of homology“)
<i>Lac Z</i>	Gen der $\beta$ -Galactosidase
LB	Luria Bertani
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
LMP	latentes membran protein
loxP	Orte der überschneigung im Phagen P1 („locus of crossover (x) of phage P1“)
$\lambda$	Wellenlänge
M	molar
MACS	„Magnetic associated cell sorting“ Cell Sortierung nach magnetischer Markierung
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
mg	Milligramm
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ Ci	Mikrocurie
$\mu$ F	Mikrofaraday
$\mu$ -Kette	schwere Kette des Immunglobulins
Min.	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
mM	Millimol
MMC	Mitomycin C
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MPW	deionisiertes Wasser („millipore water“)
mRNA	Boten RNA („messengerRNA“)
msec	Millisekunden
mV	Millivolt
MZB-Zellen	Margianl Nonen B-Zellen
Neo	Neomycin
<i>neo<sup>r</sup></i> -Gen	Neomycinresistenz-Gen
NF $\kappa$ B	Kernfaktor- $\kappa$ B („nuclear factor- $\kappa$ B“)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP-CGG	4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl hapten conjugiert mit „Chicken Gamma Glubulin“
NPC	Nasopharynx Karzinom
NS	nodular sklerosierendes Hodgknin Lymphom
n.s.	nicht spezifisch
OD	optische Dichte
ORF	offenen Leserahmen („open reading frame“)



## Abkürzungen

---

PBS	Phosphat-gepufferte Saline („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
p.c.	„post coitum“
PGK	Phosphoglyceratkinase
Pre-BCR	Pre-B-Zell-Rezeptor
RFP	rotes fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
SAS	Spleißakzeptorstelle
SA	kurzer Arm der Homologie („short arm of homology“)
SAP	Alkaline phosphatase des Schafs („sheep alkaline phosphatase“)
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulphate“)
Sec.	Sekunde
SSP	„salomon sperm DNA“, Lachssperma-DNA
STAT	Signaltransduktions-aktivierter Transkriptionsfaktor
Tab.	Tabelle
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TE	Tris-EDTA
TNF-R	„tumor necrosis factor receptor“
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TV	Targeting Vektor
U	„Units“ Enzym Einheit
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
WT	Wildtyp
XLPS	„X-linked-lymphoproliferative-syndrome“

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

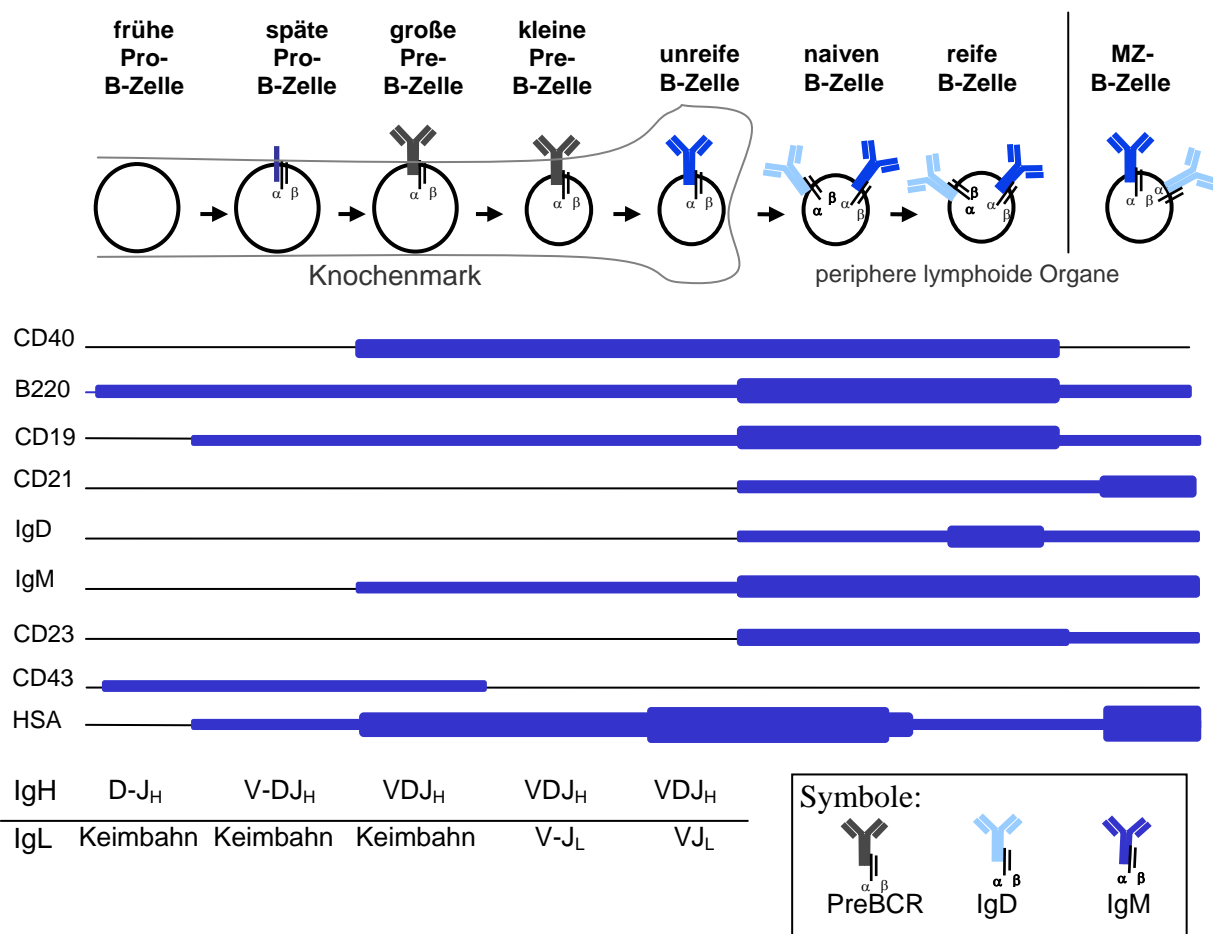
Als Schutz vor den verschiedensten Arten von Pathogenen, denen unser Organismus ausgesetzt ist, haben sich eine Reihe von hoch spezialisierten Zelltypen entwickelt, die das Immunsystem des Körpers bilden. Die Zellen des Immunsystems entwickeln sich wie alle zellulären Bestandteile des Blutes aus hämatopoetischen Stammzellen, die sich bei ausgewachsenen Säugern im Knochenmark befinden. Die Stammzellen liefern durch ständige Teilung Vorläuferzellen, die sich zunächst zu myeloiden und lymphatischen Vorläuferzellen differenzieren. Die myeloiden Vorläuferzellen können sich zu Granulozyten und Makrophagen weiter entwickeln, die als Hauptbestandteil des angeborenen Immunsystems agieren. Die lymphatischen Vorläufer entwickeln sich zu Lymphozyten, die sich in B-Lymphozyten und T-Lymphozyten untergliedern. Die Lymphozyten sind an der adaptiven Immunantwort beteiligt, bei der man die zelluläre von der humoralen Immunantwort unterscheidet. Die zelluläre Immunantwort ist für die Erkennung und Beseitigung intrazellulärer Erreger wie z.B. Viren notwendig und wird von einer Gruppe der T-Zellen initiiert, die als zytotoxische T-Zellen bezeichnet werden. Die humorale Immunantwort beruht in erster Linie auf der Wirkung von Antikörpern, die von B-Zellen sezerniert werden. Die B-Zellen werden dabei durch die T-Helferzellen unterstützt. Diese Interaktion wird auf ideale Weise durch das Komplementsystem ergänzt, welches zur Lyse der Erreger beiträgt. Sowohl B- als auch T-Lymphozyten unterliegen während ihrer Entwicklung einer strengen Selektion, die auf die Bildung eines für jede Zelle einzigartigen funktionalen und nicht autoreaktiven Rezeptors ausgerichtet ist.

## 1.2 Die B-Zellentwicklung

B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen, deren Entwicklungsphasen hauptsächlich von der Bildung eines funktionalen B-Zell-Rezeptors (B cell receptors -BCR) (Hesslein and Schatz, 2001) geprägt, aber auch durch die Expression verschiedener Oberflächenproteine gekennzeichnet sind (Abb.1.1). Die Stammzellen differenzieren zunächst zu frühen Pro-B-Zellen, in denen es durch somatische Rekombination zu einer Neuordnung der D- und J-Segmente im Immunglobulin Locus (Ig-Lokus) der schweren Kette (IgH) kommt. Die Rekombination der V-Segmente des Ig-Lokus an die D- und J-Segmente markiert den Übergang von der frühen Pro-B-Zelle ( $B220^+CD19^-CD43^+$

HSA<sup>-</sup>) zu der späten Pro-B-Zelle (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>HSA<sup>+</sup>). Während der Rekombination der V-, D- und J-Segmente der schweren sowie später der V-J-Segmente der leichten Kette des Immunglobulin-Lokus, fügt die Terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) zwischen diesen Elementen Nukleotide ein. Durch diesen Prozess wird die Antikörpervielfalt erhöht, es kann jedoch auch zu einer Verschiebung des Leserahmens oder zu der Erzeugung eines Stopp-Kodons kommen, wodurch das Protein trunkiert werden kann. Aus diesem Grund ist eine Überprüfung der Funktion der entstandenen schweren Kette ( $\mu$ -Kette) unbedingt erforderlich (Gauss and Lieber, 1996; Rajewsky, 1992). Dazu wird die  $\mu$ -Kette in Kombination mit  $\lambda 5$  oder VpreB, exprimiert. Diese können die leichte Kette der Immunglobuline ersetzen und mit einer funktionalen  $\mu$ -Kette einen Pre-B-Zell-Rezeptor („Pre B Cell Receptor“ = Pre-BCR) bilden (Bossy et al., 1991; Kudo and Melchers, 1987; Melchers et al., 1993; Sakaguchi and Melchers, 1986). Nur wenn es der Zelle gelingt, einen funktionalen Pre-BCR auf der Oberfläche zu präsentieren, kann diese, als große Pre-B-Zelle (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>HSA<sup>hoch</sup>) bezeichnete Zelle, in die nächste Phase der Differenzierung gehen. In dieser werden die VJ-Elemente der leichten Ketten im Ig $\kappa$ - oder Ig $\lambda$ -Lokus rearrangiert. In den meisten Fällen kommt es zunächst zu einer Rekombination der Elemente des Ig $\kappa$ -Lokus. Kann die Zelle anschließend keine produktive leichte Kette bilden, kommt es zu einer Rekombination der Elemente des Ig $\lambda$  Lokus. Ist die in dieser Phase als kleine Pre-B-Zelle (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>HSA<sup>hoch</sup>) bezeichnete Zelle in der Lage, einen reifen B-Zell-Rezeptor mit schwerer und leichter Kette auf der Oberfläche zu präsentieren, werden weitere Rekombinationsprozesse gestoppt (Rajewsky, 1996). Durch diesen als „allelic exclusion“ bezeichneten Prozess wird verhindert, dass die Zelle mehr als einen Typ funktioneller Immunglobuline bildet (Kitamura et al., 1992; Kitamura and Rajewsky, 1992). Die danach als unreife B-Zelle bezeichnete Zelle unterliegt im Knochenmark einer weiteren Selektion gegen die Bildung eines autoreaktiven Rezeptors. Wird in dieser Phase durch die Bindung eines körpereigenen Antigens ein B-Zell-Rezeptorsignal ausgelöst, kann die Zelle durch erneute Rekombination der Elemente des noch nicht verwendeten Allels versuchen, einen nicht autoreaktiven B-Zell-Rezeptor zu produzieren (Edry and Melamed, 2004). Gelingt es der Zelle nicht, so leitet sie den eigenen Tod, die Apoptose, ein. Ist dieser als „receptor editing“ bezeichnete Prozess jedoch erfolgreich, oder ist es der Zelle vorher gelungen, einen nicht autoreaktiven B-Zell-Rezeptor zu bilden, verlässt sie als unreife B-Zelle das Knochenmark und zirkuliert in der Lymphe und im Blut. Die unreifen B-Zellen wandern von dort als so genannte transitionelle B-Zellen (T-B-Zellen) in die Milz ein. Dort können sie sich zu follikulären oder Marginalzonen-B-Zellen (MZB) entwickeln. Während die MZB-Zellen am

Rand der Follikel verbleiben, sind die follikulären Zellen mobil. Alle zirkulierenden IgM- und IgD-positiven Zellen, die auch als naive B-Zellen bezeichnet werden, passieren immer wieder die Follikel der sekundären lymphatischen Organe, zu denen beispielsweise die Milz und die Lymphknoten gehören. Dort erhalten sie Überlebenssignale von follikulären-dendritischen Zellen (FDC), wodurch sie weiter zirkulieren können (Kosco and Gray, 1992). Da die Anzahl der Follikel und der darin enthaltenen FDCs begrenzt ist, kann nur eine gewisse Anzahl an B-Zellen überleben, wodurch deren Menge reguliert wird (Cyster et al., 1994). Insgesamt gelangen nur etwa 10% der im Knochenmark gebildeten B-Zellen in die Peripherie. Von diesen sterben etwa 80% während der ersten Tage, weshalb sich letztendlich nur etwa 3% der im Knochenmark entstandenen unreifen B-Zellen zu langlebigen reifen B-Zellen entwickeln können (Rajewsky, 1996). Dies veranschaulicht sowohl die starke Selektion, der die B-Zellen in der frühen Entwicklung unterliegen, als auch die Energie, die der Organismus in ein gut funktionierendes Immunsystem und somit in die Abwehr von Erregern investiert.



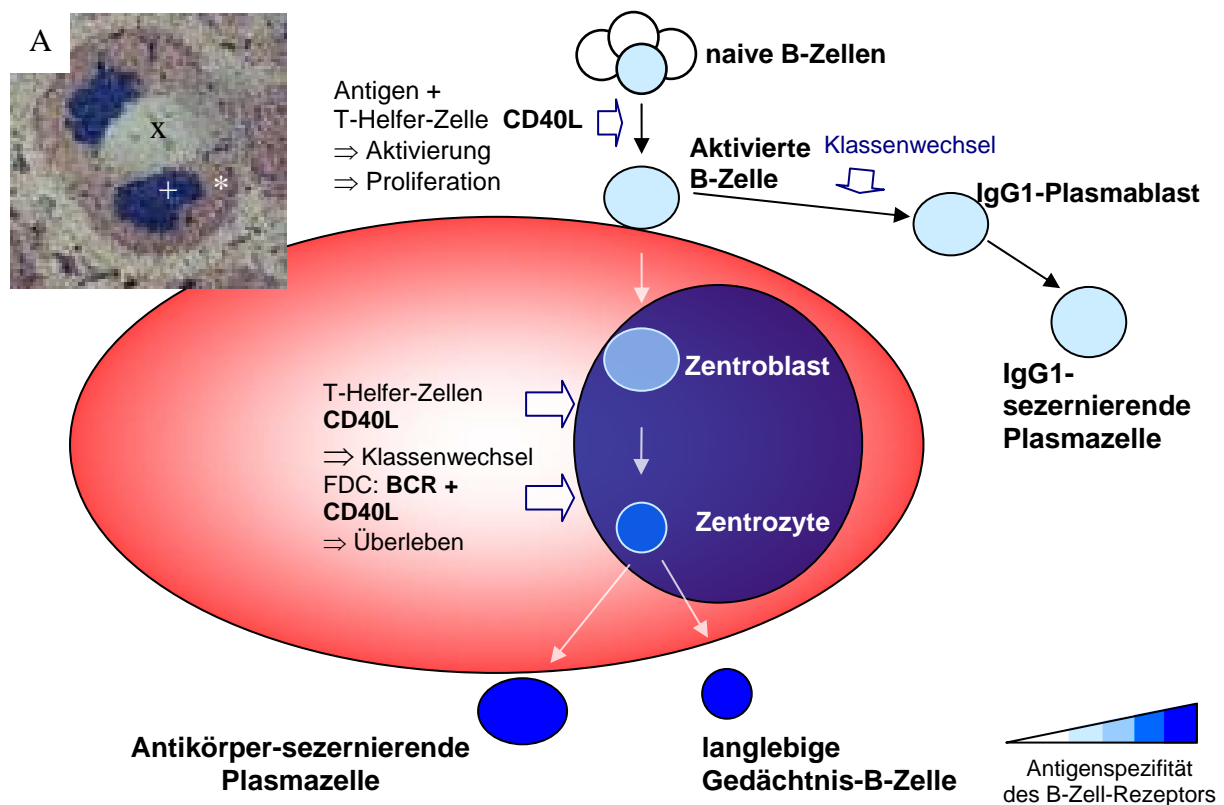
**Abbildung 1.1 Charakteristische Marker der B-Zellentwicklung**

Darstellung der B-Zellentwicklung mit den für die unterschiedlichen Stadien charakteristischen B-Zell-Markern, sowie der Rekombinationsstatus der Immunglobulin-Loci der Zellen Bkürzung: (MZB) Marginalzonen-B-Zelle (Benschop and Cambier, 1999).

### 1.3 B-Zellaktivierung

Die T-Zell-abhängige Immunantwort wird in der „periarteriellen lymphatischen Scheide“ (PALS) der Milz eingeleitet. Trifft eine naive B-Zelle auf ein T-Zell-abhängiges Antigen, welches sie mit ihrem Rezeptor binden kann, nimmt sie dieses zusammen mit dem Rezeptor auf und präsentiert es über den „major histocompatibility complex II“ (MHC-Klasse-II) auf der Zelloberfläche (Abb. 1.2). Stößt die B-Zelle in dieser Phase auf T-Zellen, die durch dasselbe Antigen bereits aktiviert wurden, können diese es erkennen und ihrerseits die B-Zellen stimulieren (Parker, 1993). Die Aktivierung der B-Zelle erfolgt zum einen durch die von T-Helferzellen ausgeschütteten Zytokine und zum anderen durch die direkte Interaktion mit den T-Zellen über die von diesen gebildeten Liganden, wie z.B. dem CD40-Liganden (CD40L), der mit dem CD40-Rezeptor (CD40) der B-Zelle interagiert. Die aktivierten B-Zellen wandern an den Rand der T-Zell-Zone, wo sie klonal expandieren (Zur Übersicht Janeway et al., 2005). In einem Teil der aktivierten B-Zellen kommt es zum Klassenwechsel des Immunglobulin-Lokus. In diesem Prozess erfolgt durch nicht-homologe-Rekombination der „Switch“-Region ein Wechsel der Isotypen von IgM zu IgG1 (Gray et al., 1996). Diese Zellen differenzieren zu extrafollikulären Plasmazellen, die niederaffine Antikörper sezernieren (MacLennan et al., 2003). Während der eine Teil der aktivierten B-Zellen auf diese Weise für eine schnelle, jedoch nicht sehr spezifische Immunantwort sorgt, nimmt der andere Teil an der Keimzentrumsreaktion teil, um hochspezifische Antikörper zu entwickeln. Dieser Teil der B-Zellen wandert zunächst in die primären Lymphfollikel, wo die Zellen weiter proliferieren und unter Stimulation durch Antigen präsentierende follikuläre dendritische Zellen Keimzentren (Germinal center (GC)) aufbauen (Jacob and Kelsoe, 1992) (Abb. 1.2). Die schnell proliferierenden, als Zentroblasten bezeichneten B-Zellen, bleiben im T-Zell-nahen Bereich des Keimzentrums. In ihnen werden durch somatische Hypermutation etwa  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  Mutationen je Base und Generation in den Genen der variablen Region des Immunglobulins eingefügt (Papavasiliou and Schatz, 2002). Die Affinität des neuen Rezeptors zum Antigen wird auf diesen als Zentrozyten bezeichneten Zellen überprüft. Bei diesem Prozess spielen die FDCs eine wichtige Rolle. Sie präsentieren Antigene, um deren Bindung die B-Zellen konkurrieren. Nur Zentrozyten, die in der Lage waren, einen BCR zu entwickeln, der mit hoher Affinität an das Antigen bindet, können mit diesen lange genug in Kontakt bleiben, um durch das BCR-vermittelte Signal zu überleben. Die Zellen durchlaufen mehrere Runden dieser Proliferations-, Mutations- und Selektions-Phase, wodurch die Bindungsspezifität des B-Zell-Rezeptors weiter gesteigert wird, und es zur so genannten Affinitätsreifung kommt (Liu et al., 1997). Neben dem Antigenkontakt benötigen die

Zentrozyten wieder die Kostimulation durch T-Helfer-Zellen, die das von den B-Zellen auf den MHC-Klasse II-Komplexen präsentierte Antigen erkennen. Bei diesem Prozess lösen die T-Zellen erneut das durch den CD40-Rezeptor vermittelte Signal aus. Durch dieses Signal wird der Klassenwechsel der B-Zellen eingeleitet, bei dem es zum Wechsel der Isotypen von IgM und IgD zu IgA, IgG oder IgE kommt (Hasbold et al., 1998; Jabara et al., 1990). Aus den Zentrozyten bilden sich entweder Plasmazellen, die hochaffine Antikörper sezernieren, oder langlebige Gedächtnis-B-Zellen (McHeyzer-Williams and Ahmed, 1999).



**Abbildung 1.2 B-Zellaktivierung und Keimzentrumsreaktion**

Darstellung der Keimzentrumsreaktion einer B-Zelle und damit verbundene Affinitätsreifung des B-Zell-Rezeptors (BCR) nach Antigenkontakt. (A) Gefrierschnitt eines Follikels, in dem die B-Zellen mit IgM-Antikörper in (rot), und die Keimzentrumszellen mit dem Marker PNA (blau) detektiert wurden (Rose et al., 1980; Rose et al., 1981). Zeichen: (x)=T-Zell-Zone; (\*)= B-Zell Zone, (+)= Keimzentrum. Der Farbcode wurde im Schema übernommen.

## 1.4 Der CD40-Rezeptor

Der CD40-Rezeptor spielt bei verschiedenen Prozessen der B-Zellentwicklung eine entscheidende Rolle. Er gehört zur Familie der „Tumor Necrosis Factor“-Rezeptoren (TNF-R) und wurde zuerst auf B-Lymphozyten entdeckt, wird aber auch in Monozyten, dendritischen Zellen (DC) sowie Endothel- und Epithelzellen exprimiert.

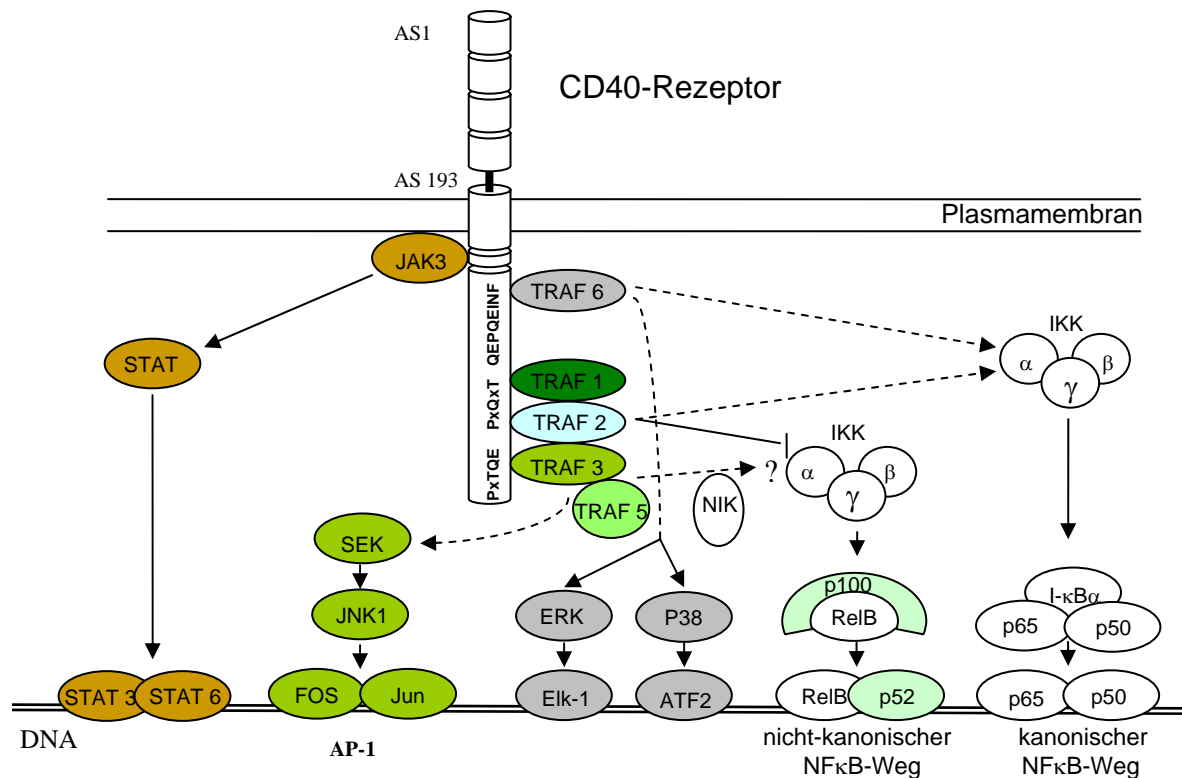
Der CD40-Rezeptor der Maus besteht aus 305 Aminosäuren (AS), mit einer 193 AS großen extrazellulären Region, die die charakteristischen vier Cystein-reichen, repetitiven Motive der TNF-R Proteinfamilie trägt. Außerdem besitzt der Rezeptor eine 21 AS große „leader Sequence“, eine 22 AS lange Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Signaldomäne mit einer Länge von 90 AS. Als typisches Typ I Transmembranprotein befindet sich sein C-Terminus innerhalb und der N-Terminus außerhalb der Zelle, wobei es die Plasmamembran nur einmal durchspannt. Die AS-Sequenz des menschlichen CD40 stimmt mit der des murinen Rezeptors zu 62% überein. Die Homologie der Signaldomäne liegt sogar bei 78% und die der letzten 53 carboxyterminalen AS, welche die für die Signaltransduktion wichtigsten Aminosäuren enthalten, bei 100%. Die CD40-Rezeptoren der beiden Spezies sind funktionell äquivalent. So konnte durch die Integration des humanen CD40 in CD40-defiziente Mäuse der normale Phänotyp der Mäuse wieder hergestellt werden. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die Erkenntnisse, die beim Studium der Signaleigenschaften von CD40 in einer der beiden Spezies gesammelt wurden auch für die andere gilt (Harnett, 2004; van Kooten and Banchereau, 2000).

Die durch den CD40-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion wird durch die Bindung des trimeren Liganden CD40L initiiert, der hauptsächlich auf aktivierten CD4 positive T-Zellen exprimiert wird (Hollenbaugh et al., 1992). Es konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor nur als Trimer aktiv ist. Es ist jedoch umstritten, ob die Multimerisierung erst durch die Ligandenbindung zustande kommt (Peitsch and Jongeneel, 1993; van Kooten and Banchereau, 2000), oder ob der Rezeptor möglicherweise vorher in trimere Form vorliegt und erst durch eine Konformationsänderung aktiviert wird (Chan et al., 2000).

Die Signaldomäne des CD40-Rezeptors besitzt selber keine katalytische Aktivität, enthält jedoch zwei Bindestellen mit PxQxT-Motiven, an die TRAF-Proteine (TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren), binden (Abb.1.3). Es konnte die Interaktion mit den Proteinen TRAF 1, 2, 3, 5 und 6 nachgewiesen werden. Über diese werden der kanonische und der nicht-kanonische NFκB-Signalweg („nuclear factor-κB“), (Berberich et al., 1994; Coope et al., 2002), der Jak-STAT-Signalweg („Janus-Kinase“; „signaltransduktions aktivierter Transkriptionsfaktor“) sowie „Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen“ (MAPK) wie p38, JNK und ERK aktiviert (Dallman et al., 2003; Harnett, 2004; van Kooten and Banchereau, 2000).

Das CD40-Signal führt zu einer verstärkten Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, A1 und A20, sowie Pim-1 und c-Myc. Auch die Expression von B-Zell Aktivierungsmarkern und Adhäsionsmolekülen wie z.B. CD23, CD30, CD80, CD86, CD95, MHC-Klasse II, LFA-1, LFA3 und ICAM, sowie von löslichen Cytokinen wie IL6, IL10,

TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$ , wird durch das CD40-Signal induziert (Dallman et al., 2003; Harnett, 2004).



**Abbildung 1.3. Schematische Darstellung des CD40-Moleküls mit Signaldomänen und den von diesen induzierten Signalwegen**

Modifiziert nach (van Kooten and Banchereau, 2000). Gestrichelte Linien: Signal erfolgt über weitere, hier nicht aufgeführte Signalmediatoren.

Als man herausfand, dass das beim Menschen auftretende „X-linked-hyper-IgM“ (HIGM) Syndrom auf eine Mutation im CD40-Liganden (CD40L) zurückzuführen ist, wurde klar, welche große Bedeutung eine funktionale CD40-CD40L-Interaktion für den Organismus hat (Ferrari et al., 2001; Ramesh et al., 1994). Patienten mit HIGM leiden an einer drastisch reduzierten oder gar völlig fehlenden T-Zell-abhängigen humoralen Immunantwort. Die Entwicklung ihrer B-Zellen ist im Stadium der naiven B-Zellen blockiert, und es kommt nicht mehr zum Klassenwechsel der Immunglobuline. Dies äußert sich in stark erniedrigten IgG- und IgA- sowie erhöhten IgM-Antikörper-Spiegeln im Blut dieser Patienten (Notarangelo et al., 1992). Mäuse mit CD40- oder CD40L-Defizienz zeigen genau wie HIGM Patienten keinen Klassenwechsel, erhöhte IgM-Antikörper-Spiegel und sind nicht in der Lage, Keimzentren zu bilden (Castigli et al., 1994; Kawabe et al., 1994; Xu et al., 1994). Durch diese Beobachtungen wurde klar, dass die CD40-CD40L-Interaktion für die Aktivierung der B-Zellen bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort, dem Klassenwechsel der Immunglobuline und der Selektion von B-Zellen mit hochaffinem BCR erforderlich ist.



## 1.5 Das Epstein-Barr-Virus

Das Immunsystem ermöglicht es dem Organismus, flexibel auf den Angriff verschiedener Viren zu reagieren und diese zu bekämpfen. Diese haben ihrerseits unterschiedliche Mechanismen entwickelt, das Immunsystem zu umgehen. Während einige die Strategie verfolgen, sich so schnell wie möglich zu replizieren bevor sie durch das Immunsystem eliminiert werden, versuchen andere, der Erkennung durch die Immunantwort zu entgehen. Das Epstein-Barr-Virus (EBV) gehört zu den Viren, denen es gelungen ist, einen Mechanismus zu entwickeln, der es ihm erlaubt, unerkannt vom Immunsystem lebenslang im Menschen zu persistieren (Babcock et al., 1998).

Das Epstein-Barr-Virus wird auf Grund seiner Struktur den  $\gamma$ -Herpesviren zugeordnet. Es infiziert hauptsächlich humane B-Lymphozyten, die es zur Proliferation anregen kann. Nach der Primärinfektion persistiert EBV in langlebigen Gedächtnis-B-Zellen.

Etwa 95% der Weltbevölkerung sind mit EBV infiziert. In den Entwicklungsländern infizieren sich die Menschen meist vor dem Erreichen des dritten Lebensjahres. In Ländern mit hohem Hygienestandard erfolgt die Serokonversion oft erst in der Pubertät. Während die Infektion im Kindesalter meist inapparent verläuft, kommt es bei einer späteren Infektion häufig zur Ausprägung der Infektiösen Mononukleose (IM), einer Krankheit, die im Volksmund „Pfeiffersches Drüsenfieber“ genannt wird. Das Virus ist in der akuten Phase der Infektion, die etwa vier bis sieben Wochen andauert, in bis zu 10% der im Blut zirkulierenden B-Lymphozyten nachzuweisen. Die Infektion führt zu einer starken Stimulation der T-Zellen, die in der akuten Phase bis zu 50% der atypischen Lymphozyten im Blut ausmachen und für einen Großteil der Symptome verantwortlich sind. Oft kommt es zu einem starken Anschwellen der Lymphknoten im Halsbereich sowie zur Ausprägung einer Hepatosplenomegalie. Nach Ablauf der akuten Phase findet man die latent mit EBV infizierten Gedächtnis-B-Zellen im Blut und in den lymphatischen Organen, wobei von einer Million Gedächtnis-B-Zellen nur 1 bis 50 infiziert sind (Thorley-Lawson, 2001).

## 1.6 Lebenszyklus des Epstein-Barr-Virus

EBV wird über den Speichel von Mensch zu Mensch übertragen. Das Virus infiziert zunächst B-Zellen, die sich im Epithel des Oropharynx befinden. Wie *in vitro* gezeigt wurde, scheint das Virus durch Bindung des Glykoproteins gp350/220 mit dem C3d-Komplementrezeptor CR2 (CD21) auf reifen B-Zellen Kontakt aufzunehmen, um anschließend durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle zu gelangen (Nemerow et al., 1985). Für diesen Prozess wird außerdem die Interaktion des viralen Proteins gp42 mit dem zellulären HLA-DR

benötigt (Haan et al., 2000; Speck et al., 2000). In der Zelle gelangt die virale doppelsträngige DNA zunächst in den Zellkern, wo sie zirkularisiert und amplifiziert wird. Das virale Genom bleibt in den B-Zellen in mehreren Kopien als Episom erhalten und wird bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben.

Während der ersten Expansionsphase, die als Latenzphase III bezeichnet wird, werden neun virale Proteine exprimiert. Diese so genannten latenten Proteine sind entweder im Kern (EBV Nuclear Antigens) EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP oder in der Plasmamembran (Latente Membran Proteine) LMP1, LMP2A und LMP2B der infizierten B-Zelle lokalisiert. Zusätzlich werden zwei nicht polyadenylierte RNAs, EBER1 und EBER2 und die BARF0 RNA transkribiert (zur Übersicht Cohen 2004). Die Expression dieser viralen Gene führt zur Aktivierung der infizierten B-Zellen. So konnten in diesen die verstärkte Expression von Aktivierungsmarkern und Adhäsionsmolekülen wie ICAM1, CD23, B7.1/CD80, B7.2/CD86 und der Haupt-Histokompatibilitäts-Moleküle MHC-Klasse I und MHC-Klasse II nachgewiesen werden. Von den viralen Genen sind fünf für die Immortalisierung von B-Zellen essenziell. Dazu gehört EBNA1, welches für die Replikation des viralen Episoms notwendig ist, EBNA2, EBNA3A und EBNA3C, die für die Aktivierung und Regulierung der Transkription der viralen Gene benötigt werden, und LMP1, einem Signalprotein (Cohen, 2000). In der Latenzphase III kommt es zu einer starken Immunantwort gegen die infizierten B-Zellen, da bis auf EBNA1 alle latenten Proteine Epitope tragen, die auf MHC-Klasse I-Molekülen der B-Zelle präsentiert werden und dadurch eine effektive T-Zell-Erkennung ermöglichen. Durch eine bald nach der Infektion einsetzende spezifische T-Zell-Antwort der CD8 positiven Zellen, wird eine unkontrollierte Expansion der infizierten B-Zellen verhindert (Rickinson and Moss, 1997). Einige der EBV-positiven B-Zellen können den T-Zellen entgehen, indem sie die EBV-Gene abschalten. In der Latenzphase I/0, die in ruhenden Gedächtnis-B-Zellen nachgewiesen wurde, werden EBNA1 und die EBER RNAs oder auch überhaupt keine viralen Gene exprimiert. In diesem Zustand gelingt es dem Virus, der Immunantwort zu entgehen und dauerhaft in den Zellen zu persistieren. Einige EBV-infizierte B-Zellen exprimieren EBNA1, LMP1, LMP2A und die EBER RNAs. Es wird vermutet, dass es sich bei dieser so genannten Latenzphase II um ein Übergangstadium zwischen der proliferativen Phase und der Phase der viralen Persistenz handelt.

Der Mechanismus der Reaktivierung ist noch unbekannt. Es scheint sich dabei jedoch um einen konstanten Prozess zu handeln, da bei infizierten Menschen immer eine geringe Menge infektiöser Partikel im Speichel nachweisbar ist (zur Übersicht Rickinson and Kieff (Cohen, 2000)).

Auf welche Weise EBV in Gedächtnis-B-Zellen gelangt, wird momentan noch kontrovers diskutiert. Die Arbeitsgruppe von Thorley-Lawson postuliert, dass EBV *in vivo* nur naive B-Zellen infiziert, und diese die Keimzentrumsreaktion durchlaufen müssen, um in das Kompartiment der Gedächtnis-B-Zellen zu gelangen (Babcock et al., 2000). Die Gruppe von Ralf Küppers hingegen hat die Theorie aufgestellt, dass das Virus sowohl naive, als auch Gedächtnis-B-Zellen infiziert und das Virus in diesen Gedächtnis-B-Zellen die viralen Gene abschaltet um Persistenz zu entwickeln (Kurth et al., 2000).

Interessanterweise finden sich die viralen Expressionsmuster der verschiedenen Latenzphasen, die bei gesunden Menschen und bei Patienten mit akuter IM identifiziert wurden, in den Zellen verschiedener EBV-assoziiierter Tumoren wieder.

## 1.7 EBV-assoziierte Erkrankungen

EBV ist ätiologisch eng mit verschiedenen malignen Erkrankungen des Menschen assoziiert, wodurch das Virus von speziellem biomedizinischen Interesse ist. Zu diesen Erkrankungen gehören Burkitt-Lymphome (BL), Hodgkin-Lymphome (HD), einige T-Zell-Lymphome sowie lymphoproliferative Erkrankungen bei immundefizienten Patienten. Auch einige epitheliale Tumoren wie Magenkarzinome und Nasopharynxkarzinome (NPC) sind mit EBV assoziiert (Niedobitek et al., 2001). Während in gesunden Menschen die durch EBV induzierte Proliferation von B-Zellen durch das körpereigene Immunsystem kontrolliert wird, kann es in immunsupprimierten Patienten zu einer unkontrollierten Proliferation der infizierten B-Lymphozyten kommen. Transplantations- und AIDS-Patienten entwickeln daher vermehrt EBV-assoziierte, lymphoproliferative Erkrankungen (Craig et al., 1993; Freter, 1990; Gratama et al., 1991; Thomas et al., 1993). Patienten mit „X-linked-lymphoproliferative-syndrom“ (XLPS), einer X-chromosomal vererbten Immunschwäche, fehlt die Fähigkeit des Immunsystems, effektiv auf die Infektion mit EBV zu reagieren (Purtilo et al., 1975). Dies kann entweder zu einer tödlich verlaufenden Mononukleose oder zu der Entstehung immunoblastischer Lymphome führen. In den Tumorzellen immunoblastischer Lymphome lassen sich Transkripte aller *ebna*-, *imp*- und *eber*-Gene nachweisen, was die Latenzphase III widerspiegelt, in der das Virus B-Zellen zur Proliferation anregt (Seemayer et al., 1995).

Das Burkitt-Lymphom gehört in Zentralafrika und Neuguinea zu den häufigsten Neoplasien im Kindesalter und ist je nach Region in 20-97% der Fälle mit EBV assoziiert. In allen Fällen findet sich eine Chromosomentranslokation, die das Protoonkogen *c-myc* mit dem Immunglobulin-Lokus fusioniert (Manolov and Manolova, 1972). In etwa 30% der Fälle

finden sich zusätzlich Mutationen des Tumorsuppressorgens *p53* (Farrell et al., 1989; Gaidano et al., 1991). In den Tumorzellen der EBV-assoziierten BL-Erkrankungen wird EBNA1 als einziges virales Protein exprimiert. Welchen Beitrag EBNA1 bei der Entstehung dieser Tumoren leistet, ist jedoch unklar.

Bei dem Nasopharynxkarzinom (NPC) handelt es sich um einen epithelialen Tumor im Nasen-Rachen-Raum, welcher in China zu den häufigsten Tumorerkrankungen bei Männern zählt. Seine Entstehung wird wahrscheinlich durch genetische Prädisposition sowie Umweltfaktoren gefördert. So wird eine Verbindung mit Nitrosaminen vermutet, die dort in größeren Mengen in der Nahrung vorkommen. Wie in den meisten anderen EBV-positiven Tumoren, z.B. in Hodgkin-Lymphomen, in T-Zell-Lymphomen, in Magenkarzinomen, lassen sich auch in EBV-positiven Nasopharynxkarzinomen die viralen Transkripte von EBNA1, LMP1, LMP2 sowie die *eber*-Transkripte nachweisen, was der Latenzphase II entspricht. Welche Rolle diese viralen Proteine bei der Tumorentstehung spielen, ist in den meisten Fällen noch unklar (Übersicht Rickinson and Kieff 2001).

Das Hodgkin Lymphom (HL) ist eine der häufigsten malignen Lymphomerkkrankungen. Es ist in 50% der weltweit auftretenden Fälle mit EBV assoziiert. Die Assoziation des klassischen HL mit EBV ist regional jedoch sehr unterschiedlich. So sind die klassischen HL in einigen afrikanischen Ländern zu 90% und bei kenianischen Kindern sogar zu 100% mit EBV assoziiert. Die Hodgkin-Lymphome entwickeln sich in den sekundären lymphatischen Organen wie der Milz oder den Lymphknoten. Typisch für diese Erkrankung sind große bizarr aussehende, einkernige Hodgkin Zellen (HD-Zellen), oder mehrkernige Hodgkin Reed/Sternberg (HRS)-Zellen, die 1% des Tumorgewebes ausmachen und von normalen T- und B-Zellen sowie Eosinophilen, Neutrophilen und Plasmazellen umgeben sind. Bei der Analyse einzelner HRS/HD-Zellen zeigte sich, dass sie von Keimzentrums-B-Zellen abstammen, die zu 25% keinen funktionalen BCR besitzen (Kuppers et al., 1994). Während das Fehlen eines BCR die B-Zellen normalerweise in die Apoptose treibt, scheinen die HRS- und HD-Zellen, durch ein transformierendes Ereignis davor bewahrt zu sein. In EBV-positiven HD-Lymphomen, die LMP1, EBNA1 und LMP2 exprimieren, könnten die notwendigen Überlebenssignale, die die Zelle vom BCR und durch CD40-Stimulation bekommt, durch die Signalaktivität von LMP1 und LMP2A stammen (Kuppers et al., 2003; Kuppers et al., 2002).

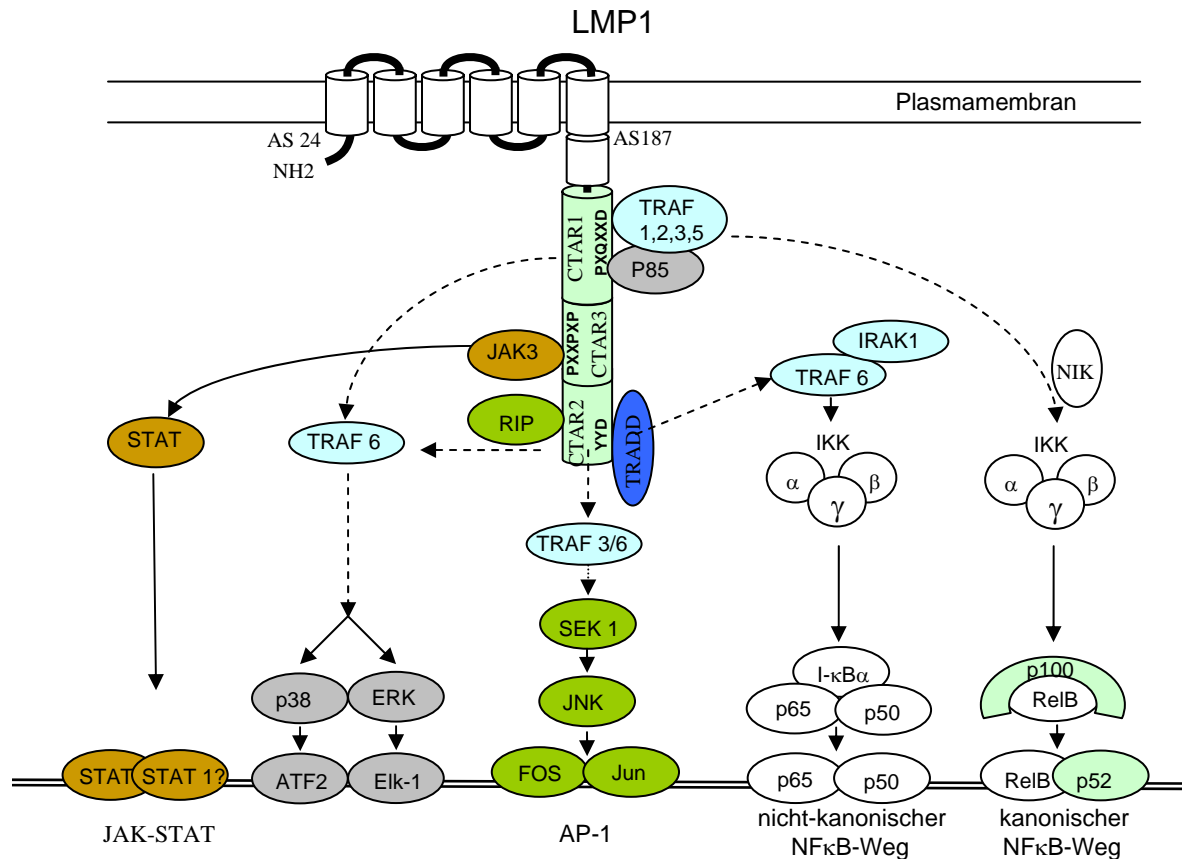
## 1.8 Die latenten EBV- Proteine

Seit vielen Jahren wird untersucht, über welchen Mechanismus die in der Latenz exprimierten viralen Proteine zur Immortalisierung von B-Zellen und zur Tumorentstehung beitragen. In den letzten Jahren wurde entdeckt, dass einige der viralen Proteine starke funktionelle Ähnlichkeit mit zellulären Proteinen haben, die für die Differenzierung, Proliferation und das Überleben der B-Zellen wichtig sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass die viralen Proteine durch die Nachahmung zellulärer Proteine zur B-Zellimmortalisierung und wahrscheinlich auch zur Tumorentstehung beitragen. So besitzt LMP2A wie der B-Zellrezeptor (BCR) ein ITAM-Motiv (Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivierungs-Motiv) in seiner Signaldomäne, wodurch es wie ein aktivierter BCR Protein-Tyrosin-Kinasen wie Syk oder Mitglieder der Src-Kinasen-Familie rekrutieren kann (Fruehling and Longnecker, 1997; Fruehling et al., 1998). In transgenen Mäusen wurde bereits gezeigt, dass LMP2A die B-Zellrezeptor-Signale ersetzen kann (Caldwell et al., 1998; Casola et al., 2004). Zwei weitere virale Proteine die zelluläre Proteine nachzuahmen scheinen sind LMP1, welches einen aktiven CD40-Rezeptor zu imitieren scheint und EBNA2, das möglicherweise einen aktiven Notch-Rezeptor nachahmt. Im Gegensatz zu den zellulären Proteinen müssen die viralen Proteine nicht durch die Bindung eines Liganden aktiviert werden und erzeugen konstitutive Signale.

### 1.8.1 Das latente Membranprotein 1 (LMP1) des Epstein-Barr-Virus

LMP1 ist absolut essenziell für die Immortalisierung von B-Lymphozyten durch EBV und wird in vielen EBV-assoziierten Tumoren exprimiert. Es ist ein direktes Zielgen von EBNA2 und in latent infizierten Zellen für die Proliferation und das Überleben der Zellen notwendig (Kilger et al., 1998). Wie anhand von Deletionsmutanten gezeigt wurde, sind für die transformierenden Eigenschaften sowohl die Transmembran- als auch die Signaldomäne notwendig (Mosialos, 2001).

LMP1 hat ein Molekulargewicht von etwa 62kDa und besteht aus 386 Aminosäuren, von denen die 186 hydrophoben AS des Aminoterminus die Transmembrandomäne und die 200 carboxyterminalen AS die zytoplasmatische Signaldomäne bilden (Abb.1.4). Die Transmembrandomäne besteht aus sechs membrandurchspannenden Segmenten, die durch kurze Schleifen verbunden sind und eine Aggregation mit anderen LMP1-Proteinen vermitteln. Mit Hilfe dieser Domäne bilden die LMP1-Proteine in der Plasmamembran der Zelle multimere Signalkomplexe, wodurch sie Liganden-unabhängig ein konstitutiv aktives Signal erzeugen.



### Abbildung 1.4 LMP1 induzierte Signalwege

Modifiziert nach (Li and Chang, 2003). Gestrichelte Linien: Signal erfolgt über weitere, hier nicht aufgeführte Signalmediatoren.

Auch wenn LMP1 keine große Sequenzhomologie mit den Mitgliedern der „Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor“ (TNF-R) –Familie besitzt, teilt es mit diesen viele funktionelle Gemeinsamkeiten. LMP1 interagiert über drei Subdomänen, den „C-terminalen aktivierenden Regionen 1-3“ (CTAR1-3), mit vielen Proteinen, mit denen auch Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie interagieren. Dort binden TRAF 1, 2, 3 und 5 (Devergne et al., 1996), das „TNFR-associated death domain protein“ (TRADD) (Izumi and Kieff, 1997) und das „Rezeptor interagierende Protein“ (RIP) (Izumi et al., 1999). TRAF6 wird indirekt rekrutiert. Über die Bindung dieser Proteine kommt es zur Aktivierung des kanonischen und des nicht-kanonischen NFκB-Signalwegs (Eliopoulos et al., 2003; Huen et al., 1995). Außerdem werden der Jak-STAT Signalweg (Gires et al., 1999), sowie die MAPK p38 JNK und ERK aktiviert (Li and Chang, 2003; Roberts and Cooper, 1998). Über diese Signalwege induziert LMP1 in B-Zellen die Expression von Aktivierungs- und Adhäsionsmarkern wie CD54, MHC-Klasse II, CD23, CD95 und CD86 und von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl2, BclX und A20 (Li and Chang, 2003).

LMP1 ist das einzige virale Protein des Epstein-Barr-Virus, für das ein direktes onkogenes Potenzial nachgewiesen werden konnte. So können Nagerfibroblasten in Kultur durch LMP1-Expression transformiert werden (Baichwal and Sugden, 1988; Moorthy and Thorley-Lawson, 1993; Wang et al., 1985). Die LMP1-Expression in der Haut von transgenen Mäusen führt zur Entwicklung von epidermalen Hyperplasien (Wilson et al., 1996) und die B-Zell-spezifische Expression von LMP1 führt in Mäusen die über 12 Monate alt sind, verstärkt zur Bildung von B-Zell-Lymphomen (Kulwichit et al., 1998).

LMP1 wurde auf Grund seiner Signaleigenschaften und der Bindung der TRAF-Proteine bereits früh mit den Mitgliedern der TNF-Rezeptor Familie und vor allem dem auf B-Zellen exprimierten CD40-Rezeptor verglichen. Sowohl LMP1 als auch CD40 interagieren mit TRAF 1, 2, 3, 5 und 6. LMP1 aktiviert wie CD40 den kanonischen und nicht-kanonischen NFκB-Signalweg, außerdem den JAK-STAT-Signalweg sowie die MAPK, JNK, p38 und ERK (Abb.1.4). Ein Vergleich der Eigenschaften von LMP1 und CD40 *in vitro* zeigte, dass die Moleküle sich teilweise ersetzen können. So kann LMP1 wie ein aktivierter CD40-Rezeptor das Überleben reifer B-Zellen in Kultur verlängern (Zimmer-Strobl et al., 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des CD40-Rezeptors die Funktion von LMP1 bei der Aufrechterhaltung der B-Zellimmortalisierung ersetzen kann (Kilger et al., 1998). Für einen genaueren Vergleich der Signaleigenschaften der beiden Proteine wurden Fusionsproteine mit der Transmembrandomäne von LMP1 und der zytoplasmatischen Signaldomäne von CD40 und umgekehrt untersucht. *In vitro* zeigte sich, dass LMP1 und das Fusionsprotein LMP1/CD40 den NFκB-Signalweg gleich stark aktivieren und die Expression epidermaler Wachstumsfaktoren (EGF) induzieren können (Busch and Bishop, 1999; Gires et al., 1999; Hatzivassiliou et al., 1998).

Trotz der vielen gemeinsamen Interaktionspartner, gibt es eine Reihe von Unterschieden zwischen den Signalen dieser Proteine. Obwohl sie mit den gleichen TRAF Proteinen interagieren binden sie diese mit unterschiedlichen Affinitäten. Außerdem interagiert CD40 beispielsweise direkt mit TRAF6, während LMP1 dieses nur indirekt aktivieren kann. LMP1 wiederum ist in der Lage an TRADD zu binden was CD40 nicht kann. Einer der signifikantesten Unterschiede ist jedoch, dass LMP1 durch seine Transmembrandomäne unabhängig aktiv ist, während CD40 erst nach Bindung seines Liganden signalisieren kann (zur Übersicht Lam and Sugden 2002).

In den letzten Jahren konnte nachgewiesen werden, dass LMP1 in der Lage ist, CD40 auch *in vivo* partiell zu ersetzen. So konnte in CD40-defizienten Mäusen, in denen der Klassenwechsel der B-Zellen sowie die Bildung von Keimzentren blockiert ist, der

extrafollikuläre Klassenwechsel durch LMP1-Expression wiederhergestellt werden. LMP1-exprimierende CD40-defiziente Mäuse waren jedoch wie CD40-defiziente Mäuse nicht in der Lage, Keimzentren und hochaffine Antikörper zu bilden. Überraschenderweise führte auch in Mäusen mit funktionalem CD40 die Expression von LMP1 zur Inhibition der Keimzentrumsreaktion (Uchida et al., 1999).

### ***1.8.2 Das Epstein-Barr-Virus-kodierte Kernantigen 2 (EBNA2)***

1967 wurde eine Virusmutante (P3HR1) beschrieben, die die Fähigkeit verloren hatte, B-Lymphozyten zu immortalisieren (Hinuma et al., 1967; Miller et al., 1974). Wie sich später herausstellte, beruhte dieser Defekt auf einer Deletion von *ebna2*, sowie Teilen von *ebna-lp* (Bornkamm et al., 1982). Durch das Einbringen von *ebna2* konnte die immortalisierende Wirkung des Virus wiederhergestellt werden (Hammerschmidt and Sugden, 1989). EBNA2 ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren des Virus, und ist nicht nur für die Initiation, sondern auch für die Aufrechterhaltung der Immortalisierung von B-Zellen durch EBV notwendig (Kempkes et al., 1995).

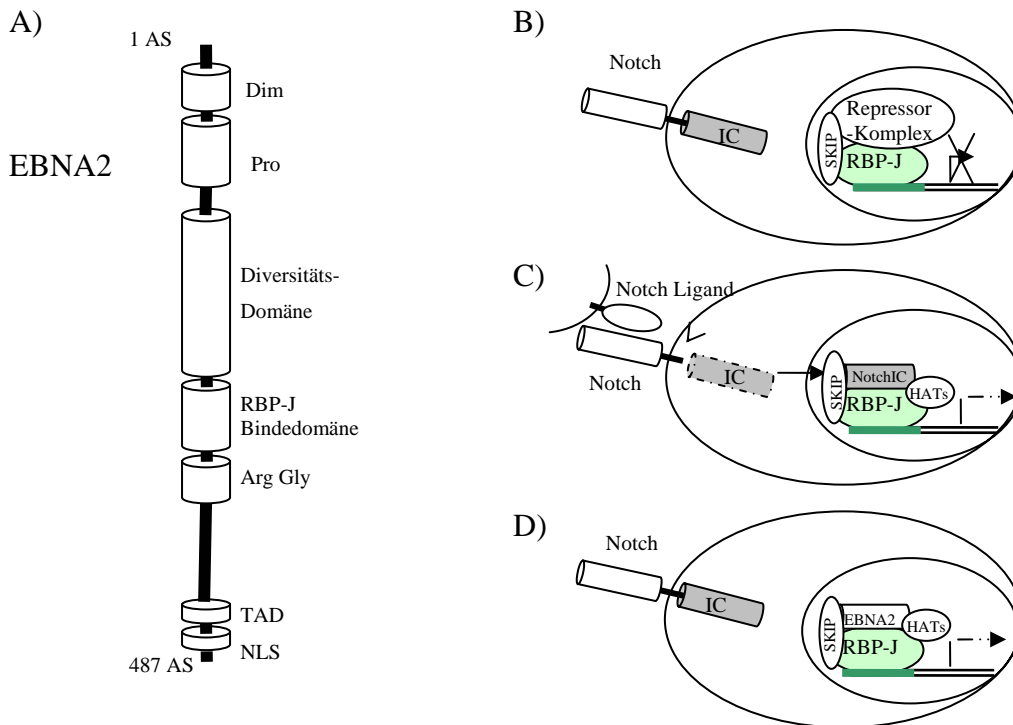
In den verschiedenen EBV-Stämmen kommen zwei Varianten des EBNA2-Proteins vor, die EBNA2A und EBNA2B genannt werden und etwa 50% Sequenzhomologie aufweisen. Beide Formen besitzen eine negativ geladene aminoterminal Region, die wahrscheinlich bei der Dimerisierung eine Rolle spielt, sowie eine prolinreiche Region, die je nach Virusstamm 10 bis 40 Proline enthält. Die EBNA2-Proteine besitzen außerdem eine Diversitäts-Domäne, in der die Sequenzen zwischen EBNA2A und EBNA2B am meisten voneinander abweichen und eine RBP-J-Bindedomäne, die sich neben einem Arginin- und Glycin-haltigen Bereich befindet. Carboxyterminal befinden sich zwei weitere Domänen, eine Transaktivierungs-Domäne sowie ein Kern-Lokalisations-Signal (Abb.1.5 A) (Zimber-Strobl and Strobl, 2001). Sowohl die RBP-J- Bindedomäne als auch die Transaktivierungs-Domäne sind für die Immortalisierung von B-Zellen notwendig (Cohen et al., 1991; Ling et al., 1993).

EBNA2 ist neben EBNA-LP das erste Gen, das nach der Infektion von B-Lymphozyten exprimiert wird. Es transaktiviert alle weiteren viralen Gene, die in der Latenzphase III exprimiert werden. Neben den viralen Genen moduliert EBNA2 auch die Expression zellulärer Gene. So konnte gezeigt werden, dass es die Expression von CD21, CD23, EB1/EBL2 und c-MYC induziert und die Expression des IgH-Lokus reprimiert (Cordier et al., 1990; Jochner et al., 1996; Kaiser et al., 1999; Wang et al., 1987).

EBNA2 aktiviert seine Zielgene durch Interaktion mit dem DNA-bindenden Faktor RBP-J (auch als CBF1 und CSL bezeichnet), der im Promotorbereich von EBNA2-regulierten Genen



bindet (Grossman et al., 1994; Henkel et al., 1994; Zimmer-Strobl et al., 1994) (Abb.1.5 B). In der Zelle interagiert hauptsächlich der aktivierte Notch-Rezeptor mit RBP-J, weshalb EBNA2 als ein funktionelles Äquivalent eines aktivierten Notch-Rezeptors angesehen wird.



**Abbildung 1.5 EBNA2**

(A) Struktur des EBNA2-Proteins mit Dimerisierungsdomäne (Dim), Prolin-reicher Region (Pro), Diversitätsdomäne (geringe Homologie zwischen EBNA2A und EBNA2B), Arginin-Glycin reiche Region (Arg Gly), Transaktivierungs-Domäne (TAD) und Kern-Lokalisierungs-Signal (NLS). (B) Bindung des Korepressor-Komplexes an Zielgene von Notch und EBNA2 durch RBP-J. (C) Spaltung des Notch-Rezeptors nach Aktivierung durch einen Liganden der Delta oder Jagged-Familie. Nach der Abspaltung der Intrazellulären Domäne (NotchIC) gelangt diese in den Kern, wo sie Koaktivatoren wie z.B. die „Histon-Acetyltransferase“ (HAT) bindet und nach Verdrängung des Korepressor-Komplexes über RBP-J-Bindung Zielgene von Notch aktiviert. (D) EBNA2 kann zusammen mit Koaktivatoren, wie Beispielsweise HAT den Korepressor-Komplex von RBP-J verdrängen, was zu einer Aktivierung der Zielgene führt. Modifiziert nach (Zimmer-Strobl and Strobl, 2001).

Die Mitglieder der Notch-Rezeptor Familie spielen bei der Regulation verschiedenster Differenzierungsprozesse eine wichtige Rolle. In der Hämatopoese ist Notch1 an der Entscheidung zwischen B- oder T-Zellentwicklung beteiligt. Dabei induziert ein Notch1-Signal in lymphoiden Vorläuferzellen die Differenzierung zu T-Zellen (Pui et al., 1999; Radtke et al., 1999). Die Expression eines konstitutiv aktiven Notch-Rezeptors (Notch-IC) in T-Zellen führt zu der Entstehung von T-Zell-Lymphomen (Pear et al., 1996). In reifen B-Zellen wird hauptsächlich Notch2 exprimiert, welches für die Entwicklung der MZB-Zellen notwendig ist (Saito et al., 2003).

Im Gegensatz zu EBNA2 müssen die Notch-Rezeptoren durch die Bindung eines Liganden, zu denen Mitglieder der Delta- oder Jagged-Familie gehören, aktiviert werden. Die Ligandenbindung führt zu mehreren proteolytischen Spaltungen des Proteins, worauf die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (Notch-IC) in den Kern gelangen kann, um dort mit RBP-J zu interagieren.

In Abwesenheit von aktiviertem Notch und EBNA2 bindet RBP-J einen Co-Repressorkomplex, der aus der Histondeacetylase1 (HDAC1), SMRT/N-CoR, CIR, Sin3A und SAP30 besteht (Lai, 2002), und führt dadurch zu der Repression von Genen (Hsieh et al., 1999; Kao et al., 1998). Die Bindung von EBNA2 und Notch-IC verdrängt diesen Co-Repressor-Komplex und rekrutiert einen Ko-Aktivator-Komplex in den Promotorbereich. Es wurde gezeigt, dass EBNA2 und Notch-IC mit den gleichen Koaktivatoren interagieren. Dazu gehören neben SKIP, die Histon-Acetyltransferase (HAT), PCAF/GCN5 und p300/CBP (zur Übersicht Kempkes et al., 2005).

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass Notch1-IC und EBNA2 sich teilweise gegenseitig ersetzen können. Unter Verwendung von konditionalen B-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass sowohl Notch1-IC als auch EBNA2 die Transkription von *Imp2A* und *cd21* induzieren, und die von Igu reprimieren kann (Strobl et al., 2000). Im Gegensatz zu diesen gemeinsamen Zielgenen konnte *Imp1*, *cd23* und *c-myc* nur von *ebna2* induziert werden (Hofelmayr et al., 2001; Strobl et al., 2000). Auch war Notch1-IC nicht in der Lage, EBNA2 bei der Immortalisierung von B-Zellen zu ersetzen. Dies mag daran liegen, dass es nicht die Fähigkeit besitzt, wie EBNA2 die Expression von c-Myc und LMP1, zwei Proteine die bei der Immortalisierung eine zentrale Rolle spielen, zu induzieren (Gordadze et al., 2001; Hofelmayr et al., 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass EBNA2 in der Lage ist, Notch-IC bei der Muskelzelldifferenzierung zu ersetzen (Sakai et al., 1998).

Obwohl EBNA2 für die Initiation und Aufrechterhaltung der EBV-vermittelten B-Zellimmortalisierung essentiell ist, wird es außer in den immunoblastischen Lymphomen in keinen der EBV-assoziierten Tumoren exprimiert. Der einzige Hinweis, dass EBNA2 onkogenes Potential besitzt, kommt aus der Analyse transgener EBNA2-Mäuse, in denen das EBNA2-Protein in Nierenzellen exprimiert wurde. Diese Mäuse entwickelten nach einiger Zeit Nierenkarzinome (Tornell et al., 1996). Ob EBNA2 in B-Zellen proliferations-induzierende Aktivität besitzt oder hauptsächlich für die Steuerung der viralen Gene verantwortlich ist, ist bis jetzt noch unbekannt.

## 2 Fragestellung

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert humane B-Zellen und hat die Fähigkeit, diese zur permanenten Proliferation anzuregen. An diesem Prozess der B-Zellimmortalisierung sind eine Reihe von viralen Proteinen beteiligt, die wichtige Signalproteine der B-Zelle zu imitieren scheinen. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem LMP1 und EBNA2, deren Expression für die Immortalisierung von B-Zellen essentiell ist.

Es ist bekannt, dass LMP1 ähnliche Signalwege wie ein aktiver CD40-Rezeptor induziert und LMP1 CD40 *in vivo* teilweise ersetzen kann. So führt die LMP1-Expression in CD40-defizienten Mäusen zur Rekonstitution des extrafollikulären Klassenwechsels jedoch nicht zur Wiederherstellung der Keimzentrumsreaktion. Erstaunlicherweise hemmt die LMP1-Expression sogar in Gegenwart eines funktionellen CD40-Rezeptors die Keimzentrumsbildung. Ein Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, inwieweit LMP1 durch die Nachahmung eines konstitutiven CD40-Signals die B-Zellentwicklung beeinflusst. Dazu wurden transgene Mäuse generiert, die B-Zell-spezifisch ein Fusionsprotein exprimieren, welches aus der Signaldomäne von CD40 und der Transmembrandomäne von LMP1 besteht und dadurch ein konstitutives CD40-Signal erzeugt. An diesen Mäusen sollte untersucht werden, ob das konstitutive CD40-Signal wie das LMP1-Signal zu einer Hemmung der Keimzentrumsreaktion und zur Entstehung maligner Erkrankungen führt.

EBNA2 ist wie auch LMP1 für die Immortalisierung von B-Zellen durch EBV essentiell. Es aktiviert ähnliche Signalwege wie ein aktiver Notch-Rezeptor, der in B-Zellen für die Differenzierung von Marginalzonen-B-Zellen verantwortlich ist. Außerdem ist EBNA2 in der Lage, verschiedene zelluläre Proteine wie zum Beispiel CD21, CD23 und c-Myc zu induzieren. Die Wirkung von EBNA2 auf B-Zellen wurde bisher nur in transformierten Zellen wie z.B. in Burkitt-Lymphomlinien oder in lymphoblastoiden Zell-Linien in Verbindung mit anderen viralen Proteinen untersucht, da EBNA2 selber nicht in der Lage ist B-Zellen zu immortalisieren. Welchen Einfluss EBNA2 auf die Differenzierung von normalen B-Zellen hat, ist daher momentan noch unklar. Um dieser Frage nach zu gehen wurde ein transgener Mausstamm generiert und untersucht, in dem EBNA2 B-Zell-spezifisch exprimiert werden konnte. Insbesondere sollte die Frage beantwortet werden, ob EBNA2 einen direkten proliferativen Effekt auf B-Zellen hat, oder ob es bei der Immortalisierung von B-Zellen nur für die Steuerung der übrigen viralen Gene, wie z.B. LMP1, verantwortlich ist, die für die Immortalisierung der B-Zellen benötigt werden. Diese Arbeit soll zeigen, welchen Einfluss LMP1 und EBNA2 auf B-Zellen *in vivo* ausüben, um zu verstehen in wieweit sie dadurch zur B-Zellimmortalisierung, der Etablierung der viralen Persistenz und der Entstehung maligner Erkrankungen beitragen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss eines konstitutiven aktiven CD40 auf die B-Zellentwicklung *in vivo*

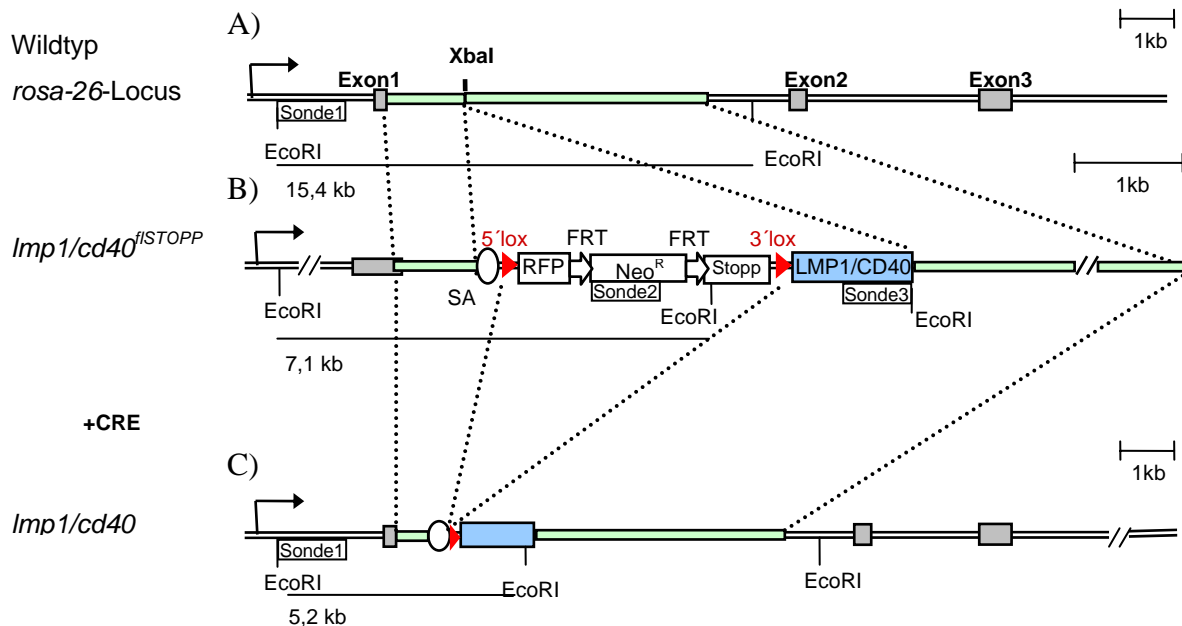
##### 3.1.1 Generierung einer LMP1/CD40-exprimierenden Maus

Durch intensive Untersuchungen an LMP1 konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass das virale Protein ähnliche Signaleigenschaften wie ein aktiver CD40-Rezeptor hat und diesen teilweise ersetzen kann. In CD40-defizienten Mäusen, in denen der Klassenwechsel der B-Zellen sowie die Bildung von Keimzentren blockiert ist, konnte durch LMP1-Expression zwar die extrafollikuläre Plasmazelldifferenzierung, nicht jedoch die Bildung von Keimzentren rekonstituiert werden. Interessanterweise wurde in Mäusen mit funktionalem CD40-Rezeptor die Keimzentrumsbildung durch die Expression von LMP1 ebenfalls blockiert. Diese Beobachtung führte zu der Frage, ob die konstitutive Aktivität oder die Signaldomäne von LMP1 dafür verantwortlich ist, dass LMP1-exprimierende B-Zellen nach T-zellabhängiger Immunisierung nicht mehr in der Lage sind, Keimzentren zu bilden.

Um zu untersuchen, ob ein konstitutives CD40-Signal *in vivo* einen ähnlichen Phänotyp wie LMP1 induziert, wurde ein transgener Mausstamm generiert, der ein Fusionsgen bestehend aus der Transmembrandomäne des viralen LMP1- (AS 1- AS 187) und der Signaldomäne des humanen CD40-Proteins (AS 223- AS 280) (Abb.3.1B), konditional exprimiert. *In vitro* wurde bereits gezeigt, dass dieses Fusionsprotein wie ein konstitutiv aktiver CD40-Rezeptor wirkt (Gires et al., 1997). Das Fusionsgen wurde in den *rosa26*-Lokus integriert (Abb.3.1A). Das *rosa26*-Gen besitzt drei Exons und kann ohne phänotypische Auswirkung homozygot inaktiviert werden.

Das *lmp1/cd40*-Gen wurde in die *XbaI*-Schnittstelle im ersten Intron des Gens integriert. Dadurch kam das Transgen unter die Kontrolle des ubiquitär aktiven *rosa26*-Promotors (Soriano, 1999). Um eine richtige Prozessierung der *lmp1/cd40*-RNA zu gewährleisten, wurde eine künstliche „Splice-Akzeptor-Stelle“ vor das Transgen inseriert und eine potentielle „Splice-Akzeptor-Stelle“ im ersten Exon des Transgens durch eine stille Mutation zerstört. Um eine zellspezifische Expression von *lmp1/cd40* zu erreichen, wurde zusammen mit dem Transgen eine von loxP-Stellen flankierte Stopp-Kassette integriert, welche die Expression des Fusionsproteins zunächst verhindert. Durch zelltypspezifische Expression der

Rekombinase Cre kann die Stopp-Kassette deletiert werden, infolge dessen das Fusionsprotein exprimiert wird (Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1 Generierung einer transgenen Maus, die LMP1/CD40 konditional exprimieren kann**

Strategie für die Insertion des *Imp1/cd40* kodierenden Gens in die *XbaI* Schnittstelle im ersten Intron des *rosa26*-Lokus (siehe Appendix 1). Durch die zelltypspezifische Expression der Rekombinase Cre kann die Stopp- und Selektionskassette entfernt und somit die Expression des Transgens gesteuert werden. Das Schema zeigt die *EcoRI*-Schnittstellen mit der die genomische DNA geschnitten wurde, sowie die Sonden, welche zum Nachweis der DNA-Fragmente nach der homologen Rekombination, sowie der Deletion der Stopp-Kassette verwendet wurden. Die erwarteten Fragmente, die nach einem Verdau der genomischen DNA mit *EcoRI* durch die verschiedenen Sonden nachweisbar sind, wurden durch dünne Linien gekennzeichnet.

Dargestellte Fragmente: (A) *rosa26*-Wildtyp-Lokus (B) *rosa26*-Lokus nach homologer Integration des *Imp1/cd40*-Targeting Vektors, (C) *rosa26*-Lokus nach homologer Integration des *Imp1/cd40*-Targeting Vektors und anschließender Cre-vermittelter Deletion der Stopp-Kassette.

Abkürzungen: Cre- Cre-Rekombinase; SAS- „Splice-Akzeptor-Stelle“; RFP- Rotes fluoreszierendes Protein; *Neo<sup>R</sup>*- Neomycin-Resistenzgen; FRT-Bindungsstelle der FLP-Rekombinase; loxP- Bindungsstelle der Rekombinase Cre (Ort der Überschneidung im Bakteriophagen P1).

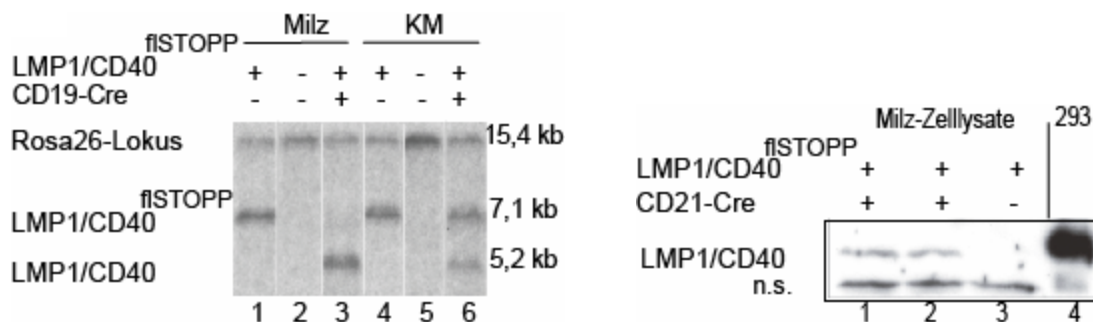
Die Integration des Fusionsgens in den *rosa26*-Lokus in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurde bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (Köln, Institut für Genetik; 2001) durchgeführt. Die homologe Rekombination des Fusionsgens mit dem *rosa26*-Lokus wurde in diesen Zellen mittels Southern-Blot mit den Sonden 1, 2 und 3 überprüft.

Die rekombinanten embryonalen Stammzellen wurden in Kooperation mit Werner Müller, (GBF-Braunschweig) in Mausblastozysten injiziert und scheinchwangeren Mäusen

implantiert. Es wurden 16 Chimären geboren, von denen eine Keimzellen trug, die von den ES-Zellen mit dem inserierten Transgen stammten. Mit den Nachkommen dieser Chimäre wurde die transgene Maus-Linie LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> etabliert.

Um die Expression des Fusionsproteins LMP1/CD40 in unterschiedlichen Stadien der B-Zellentwicklung zu erzielen, wurden Mäuse der LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>-Linie mit CD19-Cre bzw. CD21-Cre-Mäusen gekreuzt (Rickert et al., 1997) (Kraus et al., 2004). Während die Kreuzung mit CD19-Cre-Mäusen bereits zur Deletion der Stopp-Kassette in frühen Stadien der B-Zellentwicklung führt, wird diese nach Kreuzung mit CD21-Cre Mäusen nur in reifen B-Zellen deletiert.

Um die Effektivität der durch Rekombinase Cre vermittelten Deletion zu überprüfen, wurden B-Zellen aus (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen isoliert und die Deletion der Stopp-Kassette mittels Southern-Blot-Analysen überprüft (Abb.3.2A). In (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>x CD19cre)-Mäusen hatten 49% der Knochenmarks-B-Zellen und 96% der Milz-B-Zellen die Stoppkassette deletiert (Abb.3.2A). In (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD21cre)-Mäusen lag die Deletionseffizienz in der Milz bei 78%, während im Knochenmark wie erwartet keine Deletion nachzuweisen war (nicht gezeigte Daten).



**Abbildung 3.2 Deletion der Stopp-Kassette und Expression des Fusionsproteins LMP1/CD40 in murinen B-Zellen**

(A) Southern-Blot zum Nachweis der Deletionseffizienz der Stopp-Kassette: Aus (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>x CD19cre)-Mäusen wurden durch „magnetisch-assoziiertes-Zell-Sortierung“ (MACS) CD19 positive B-Zellen der Milz (Spur 1-3) und des Knochenmarks (KM) (Spur 4-6) isoliert. Als Kontrollen dienten B-Zellen von Wildtyp-Mäusen (Spur 2 und 5) und Mäuse mit dem LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>-Allel (Spur 1 und 4). Aus den Zellen wurde die DNA isoliert, mit *EcoRI* geschnitten und nach Auftrennung im Gel auf eine Membran geblottet. Die Fragmente wurden anschließend mit der Sonde 1 nachgewiesen. Das 15,4 kb Fragment weist den wt *rosa26*-Lokus, das 7,1 kb den Lokus mit integriertem Transgen und das 5,2 kb Fragment den Lokus mit Transgen, nach Cre vermittelter Deletion der Stopp-Kassette nach. (B) Expression des Fusionsproteins: Der Western-Blot wurde mit Proteinlysaten von Milzzellen aus (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD21cre)-Mäusen (Spuren 1 und 2) und LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> Mäusen (Spur 3) beladen. Als Positivkontrolle wurden Proteinlysate von 293 Zellen (Spur 4), verwendet, die transient mit einem LMP1/CD40-Expressionsvektor (pSG5-LMP1/CD40) transfiziert worden waren. Das 34 kDa große Fusionsprotein wurde mit

einem  $\alpha$ -CD40-Antikörper, welcher gegen den zytoplasmatischen Teil des humanen CD40 gerichtet war, detektiert. Abkürzungen: n.s: nicht spezifische Bande.

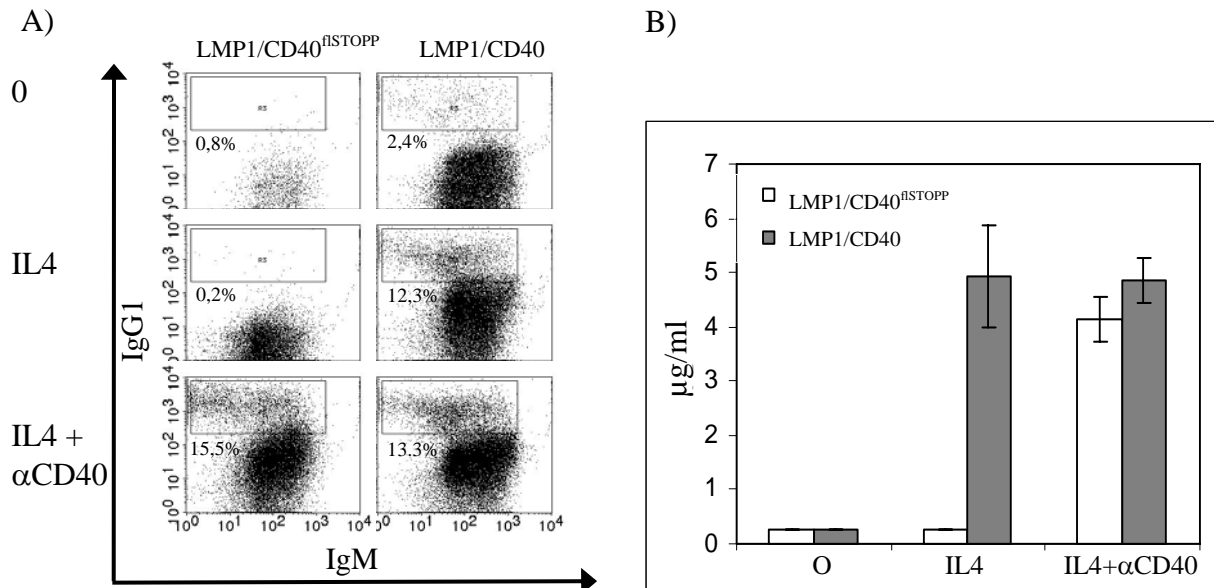
Um zu untersuchen, ob nach Deletion der Stopp-Kassette das Transgen in B-Zellen exprimiert wird, wurden Lymphozyten aus der Milz von (LMP1/CD40<sup>f1STOPP</sup>xCD19cre)- und (LMP1/CD40<sup>f1STOPP</sup>xCD21cre)-Mäusen isoliert und durch Western-Blot-Analysen die Protein-Expression von LMP1/CD40 analysiert. Als Kontrolle wurden 293 Zellen verwendet, die mit einem LMP1/CD40-Expressions-Plasmid (pSG5-LMP1/CD40) transfiziert worden waren. Das LMP1/CD40 Protein konnte sowohl in den Milzzellen von (LMP1/CD40xCD21cre)- als auch (LMP1/CD40xCD19cre)-Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 3.2B; nicht gezeigte Daten). In Zellen die kein Cre Allel besaßen, konnte kein LMP1/CD40-Protein detektiert werden, was zeigt, dass die Stopp-Kassette die Transkription des Transgens effektiv blockiert.

### ***3.1.2 Das Fusionsprotein LMP1/CD40 kann wie ein aktiver CD40-Rezeptor Klassenwechsel induzieren***

Es ist bekannt, dass Milz-B-Zellen, die in Gegenwart von agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern und IL4 kultiviert werden, einen Isotypwechsel von IgM zu IgG1 durchführen (Hasbold et al., 1998; Jabara et al., 1990). Um zu überprüfen, ob das Fusionsprotein ein aktives CD40-Signal erzeugt, wurden B-Zellen aus der Milz von LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen (LMP1/CD40<sup>f1STOPP</sup>xCD19cre) sowie von entsprechenden Kontrollen (LMP1/CD40<sup>f1STOPP</sup>) isoliert und in Medium ohne Zusätze bzw. unter der Zugabe von IL4 oder agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern und IL4 kultiviert. Nach fünf Tagen wurde die IgG1- und IgM-Expression auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Wie in Abb. 3.3A gezeigt, exprimierten 12,3% der LMP1/CD40-exprimierenden Zellen, die unter Zusatz von IL4 kultiviert worden waren, IgG1 auf der Oberfläche, während bei den Kontrollen weniger als 1% der Zellen IgG1 positiv waren. Wurden die Kontrollzellen hingegen mit IL4 und agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern kultiviert, konnten ebenfalls 15,5% IgG1-positive Zellen detektiert werden.

Bei der Stimulation von B-Zellen mit CD40 und IL4 werden nicht nur membranständige, sondern auch lösliche IgG1-Antikörper gebildet, die sezerniert werden. (Abb. 3.3B). Um die IgG1-Spiegel im Kulturüberstand zu bestimmen, wurde das Medium, in dem die Zellen sieben Tage mit den verschiedenen Zusätzen kultiviert worden waren, abgenommen, und die IgG1-Konzentrationen in diesen mittels IgG1-spezifischer ELISA -Analysen gemessen.

Während bei LMP1/CD40-exprimierenden Zellen durch Stimulation mit IL4 IgG1-Antikörper im Medium nachweisbar waren, mussten die Kontrollzellen mit IL4 und agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern kultiviert werden, um eine Sekretion von IgG1-Antikörper ins Medium zu induzieren (Abb. 3.3B).



### Abbildung 3.3 LMP1/CD40 initiiert einen konstitutiv aktiven CD40-Rezeptor

(A) Aus der Milz von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen (LMP1/CD40) und Kontrollen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>) wurden B-Zellen durch Depletion der CD43-positiven Zellen isoliert und anschließend kultiviert. Die Zellen wurden entweder in Medium ohne Zusätze (0), mit IL4 oder mit agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern ( $\alpha$ -CD40) und IL4 5 Tage lang kultiviert. Anschließend wurde die Expression von IgM und IgG1 auf der Zelloberfläche untersucht. Der Anteil der umrahmten IgG1-positiven Zellen ist in Prozent angegeben. Im FACS-Blot der Kontrolle ohne Zusätze wurden insgesamt weniger Zellen aufgetragen, da nur ein geringer Teil der Zellen ohne stimuli fünf Tage in Kultur überleben konnten dort nur wenige Zellen analysiert werden (siehe Abb. 3.19).

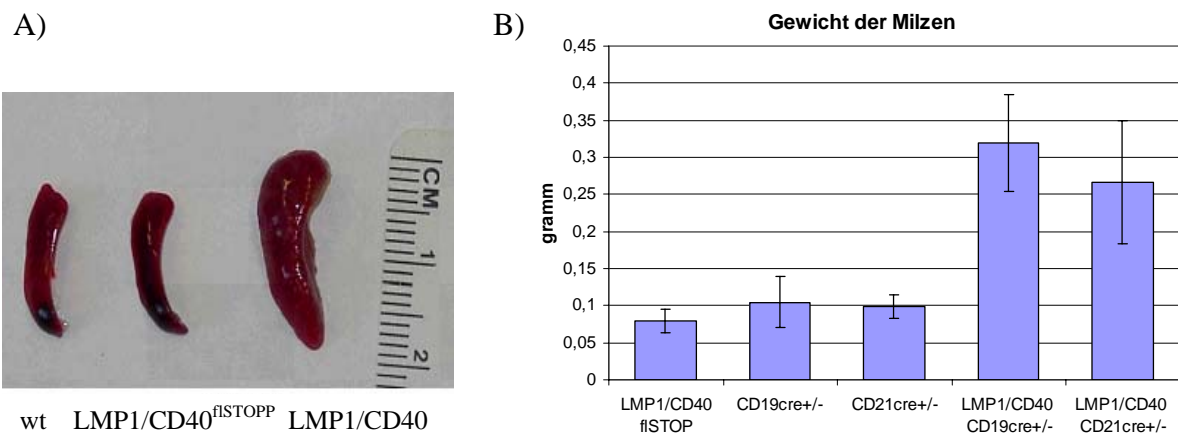
(B) IgG1-Antikörper-Titer im Überstand der unter A beschriebenen Zellen nach sieben Tagen in Kultur. Die Mengen der IgG1-Antikörper wurden mit Hilfe von ELISA-Analysen bestimmt.

Diese Ergebnisse zeigten, dass LMP1/CD40 die Interaktion des CD40-Rezeptors mit seinem Liganden bei der Induktion des Klassenwechsels funktionell ersetzen kann, und somit ein aktives CD40-Signal erzeugt.



### 3.1.3 Die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 in der Maus führt zu einer Zunahme der B- und T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen

Nachdem gezeigt worden war, dass LMP1/CD40 ein konstitutives CD40 Signal in B-Zellen der transgenen LMP1/CD40-Mäuse erzeugen kann, wurde untersucht, welche Auswirkung die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 auf das lymphatische System der Mäuse hat. Sowohl (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)- als auch (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD21cre)-Mäuse entwickelten eine stark ausgeprägte Splenomegalie (Abb. 3.4A). Die Milzen in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen, waren im Durchschnitt 3-mal schwerer als die altersgleicher Kontrollen (Abb. 3.4B).

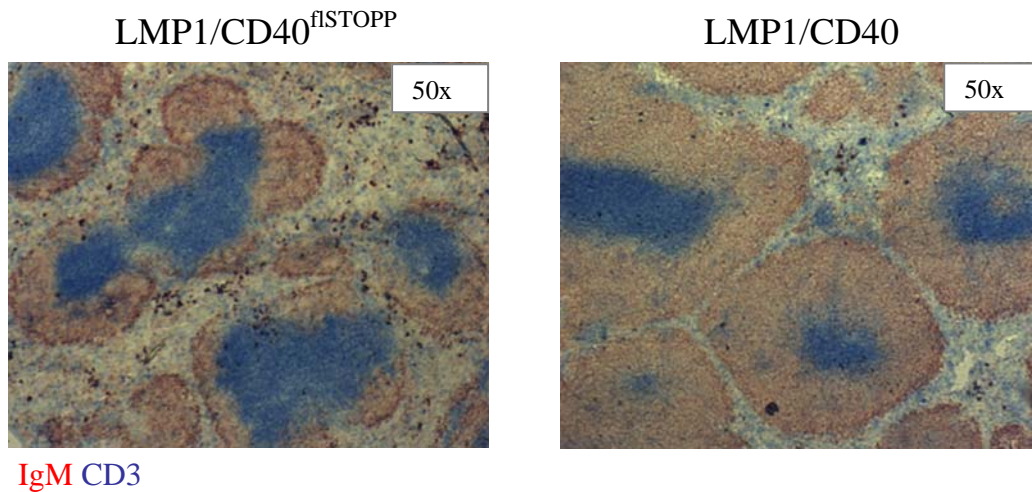


**Abbildung 3.4 Die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 führt in Mäusen zu einer Splenomegalie**

(A) LMP1/CD40-exprimierende Mäuse (LMP1/CD40) zeigten im Vergleich zu altersgleichen Kontrollen (Wildtyp-Mäuse (wt) und Mäuse, die die Stoppkassette noch enthielten (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>)) eine Splenomegalie. (B) Vergleich des Milzgewichts verschiedener Kontrollmäuse (CD19cre+/-; CD21cre+/-; LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>) mit LMP1/CD40-exprimierenden (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre; LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD21cre) -Mäusen im Alter von 8-16 Wochen. Je Gruppe wurden 3-7 Mäuse untersucht.

Um zu untersuchen, ob die LMP1/CD40-Expression neben der Splenomegalie auch zu einer Veränderung der mikroskopischen Milzstruktur führt, wurden Gefrierschnitte der Milzen angefertigt und durch Doppelfärbung mit  $\alpha$ -IgM- und  $\alpha$ -CD3-Antikörpern die B- und T-Zellen in den Follikeln angefärbt. Wie in Abbildung 3.5 gezeigt, besaßen die Follikel LMP1/CD40-exprimierender Mäuse eine klar definierte B- und T-Zell-Zone, jedoch waren die Follikel im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen stark vergrößert (Abb. 3.5). Es zeigte sich außerdem, dass die B-Zell-Zone im Vergleich zur T-Zell-Zone in LMP1/CD40-

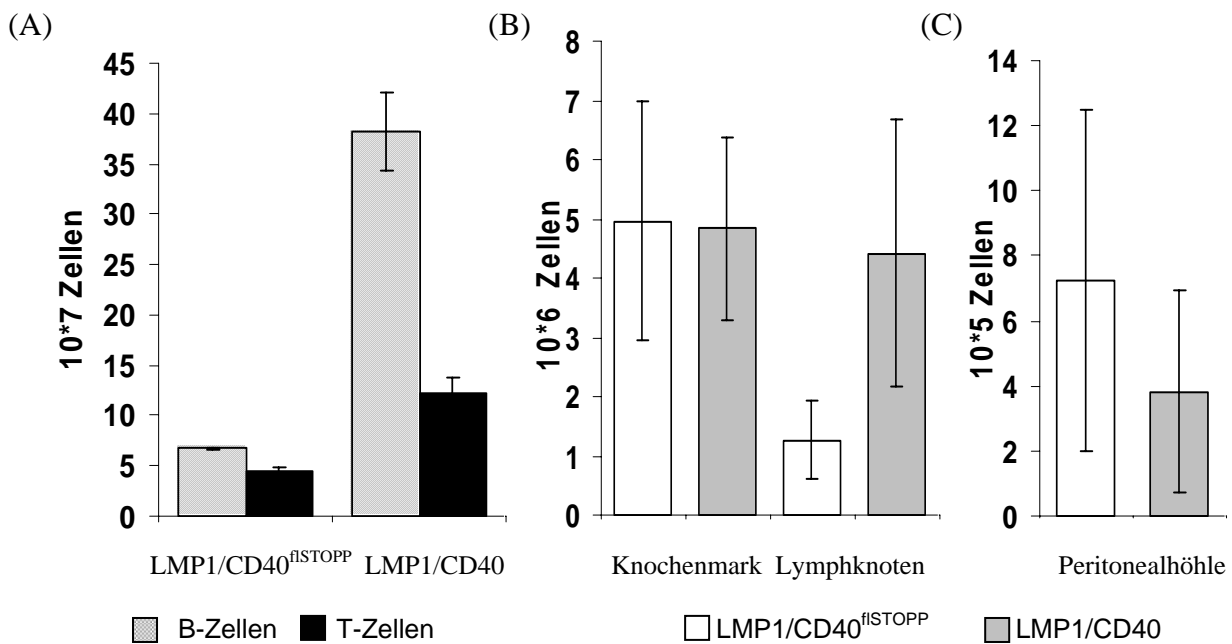
exprimierenden Mäusen vergrößert war, was darauf hinweist, dass der B-Zellanteil in diesen Mäusen erhöht ist.



**Abbildung 3.5 Die LMP1/CD40-Expression führt zu einer Follikelhyperplasie**

Gefrierschnitte der Milz von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)- (LMP1/CD40) und Kontrollmäusen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>). In den Schnitten wurden IgM-positive B-Zellen mit  $\alpha$ -IgM-Antikörpern (rot) und T-Zellen mit  $\alpha$ -CD3-Antikörpern (blau) nachgewiesen. Die Färbung macht die B- und T-Zellzonen der Follikel sichtbar. Vergrößerung 50-fach.

Um die Gesamtanzahl der B- und T-Lymphozyten zu bestimmen, wurden Einzelzellsuspensionen aus der Milz gewonnen, und die Gesamtzellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen mit  $\alpha$ -B220- und  $\alpha$ -CD5-Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Aus der Gesamtzellzahl und dem ermittelten Anteil der B- (B220<sup>+</sup>) und T-Zellen (CD5<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>) wurden die absoluten Zahlen der B- und T-Zellen errechnet. Wie in Abb. 3.6A gezeigt, war die Gesamtanzahl der B-Zellen in der Milz LMP1/CD40-exprimierender Mäuse etwa sechsmal und die der T-Zellen etwa dreimal höher als in Kontrollmäusen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>). Um zu überprüfen, ob auch in anderen lymphatischen Organen die B-Zellzahlen durch die LMP1/CD40-Expression erhöht wird, wurde der Anteil der B-Zellen (B220<sup>+</sup>) in den inguinalen Lymphknoten (LN), im Knochenmark (KM) und in der Peritonealhöhle mittels FACS-Analysen bestimmt und wie oben beschrieben auf die Gesamtzellzahl der B-Zellen zurückgerechnet. Die Zahl der B-Zellen in den inguinalen Lymphknoten war in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen ebenfalls erhöht (Abb. 3.6B). Im Gegensatz dazu war die Gesamtzellzahl der B-Zellen im Knochenmark von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen normal (Abb. 3.6C). In der Peritonealhöhle zeigte sich eine tendenzielle Reduktion der B-Zellen.



**Abbildung 3.6 Die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 führt zur Zunahme der B- und T-Zell-Zahlen in den peripheren Organen**

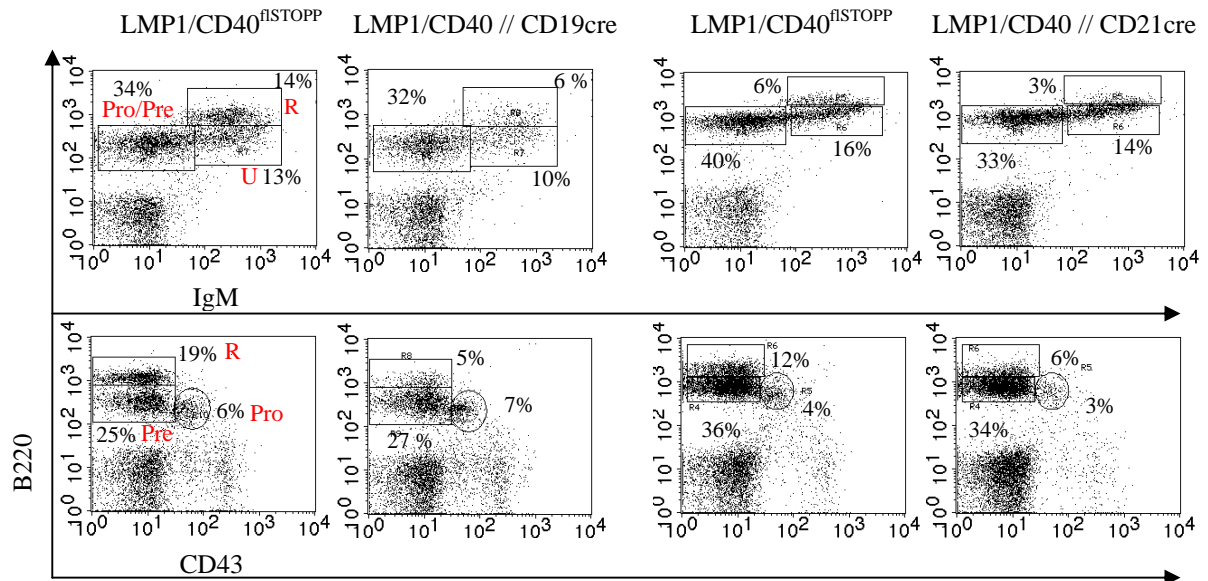
(A) Gesamtanzahl der B-Zellen (B220<sup>+</sup>) und T-Zellen (B220<sup>-</sup>,CD5<sup>+</sup>) in der Milz von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen (LMP1/CD40) und Kontrollen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>). (B) Gesamtanzahl der B-Zellen (B220<sup>+</sup>) je eines inguinalen Lymphknotens und des Knochenmarks eines Unterschenkelknochens von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen (LMP1/CD40) und Kontrollen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>). (C) Gesamtanzahl der B-Zellen (B220<sup>+</sup>) der Peritonealhöhle von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>x CD19cre)-Mäusen (LMP1/CD40) und Kontrollen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>).

Die aufgeführten Daten wurden von mindestens fünf Mäusen je Gruppe erhoben. Die Anzahl der Zellen wurde aus dem durch FACS-Analysen bestimmten Anteil der B200+ Zellen und der Gesamtzahl der isolierten Zellen berechnet.

### ***3.1.4 Durch die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 wird die frühe B-Zellentwicklung nicht beeinflusst, jedoch die Rezirkulation der reifen B-Zellen ins Knochenmark behindert***

Um zu überprüfen, ob die B-Zellentwicklung im Knochenmark durch die Expression von LMP1/CD40 beeinflusst wird, wurden die verschiedenen B-Zellpopulationen des Knochenmarks durch die Färbung mit Antikörpern gegen IgM, B220, CD43 und IgD näher untersucht. Die unterschiedlichen B-Zellpopulationen lassen sich anhand der Expression spezifischer Marker und auch durch die Expressionstärke unterscheiden. In dieser Arbeit wurden Marker für die die Populationen positiv waren mit „+“, für die sie negativ waren mit „-“ gekennzeichnet. Marker die von einzelnen Populationen sehr stark exprimiert wurden,

wurden mit „hoch“ und Marker die nur schwach exprimiert wurden mit „niedrig“ gekennzeichnet.

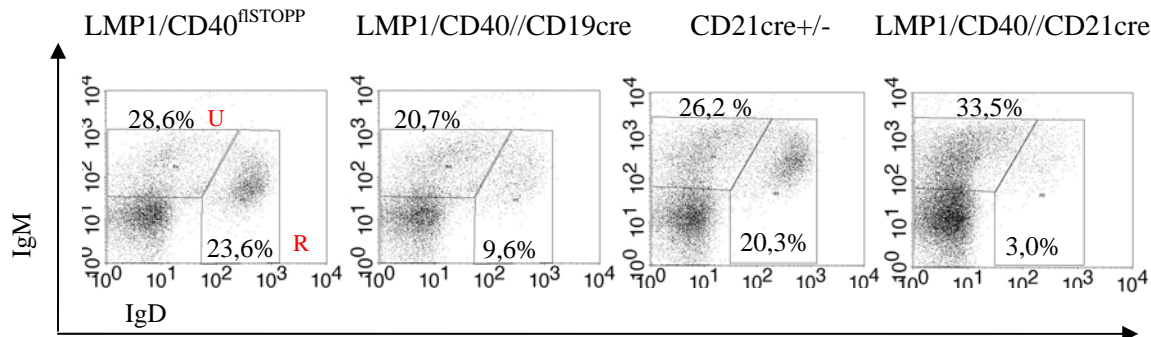


**Abbildung 3.7 Durch die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 wird die frühe B-Zellentwicklung nicht beeinflusst**

FACS-Analyse von Knochenmarkszellen von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre) (LMP1/CD40//CD19cre) und (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD21cre)-Mäusen (LMP1/CD40//CD21cre) und entsprechenden Kontrollen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>), durch Färbung mit B220, CD43 und IgM. Die Prozente geben bei der oberen Färbung den Anteil der Pro/Pre-B-Zellen (B220<sup>niedrig</sup>IgM<sup>+</sup>), unreifen B-Zellen (U) (B220<sup>hoch</sup>IgM<sup>+</sup>) und reifen rezirkulierenden B-Zellen (R) (B220<sup>hoch</sup>IgM<sup>+</sup>) an. Die zweite Färbung ermöglicht neben der Identifizierung der rezirkulierenden B-Zellen (CD43<sup>+</sup>B220<sup>hoch</sup>) auch die Unterscheidung von Pro- (CD43<sup>+</sup>B220<sup>niedrig</sup>) und Pre- (CD43<sup>-</sup>B220<sup>hoch</sup>) B-Zellen. Die ersten beiden und die letzten beiden FACS-Blots je Reihe zeigen zeitgleich angefertigte Analysen. Aufgrund leichter Varianzen bei den Färbungen werden die Kontrollen pro Analyse gezeigt.

Die Färbungen der Knochenmarkszellen LMP1/CD40-exprimierender Mäuse mit Antikörpern gegen B220 und IgM zeigte, dass das Verhältnis der Pro/Pre-B-Zellen (B220<sup>niedrig</sup>IgM<sup>+</sup>) zu unreifen B-Zellen (B220<sup>hoch</sup>IgM<sup>+</sup>) durch die Expression von LMP1/CD40 nicht beeinflusst wurde (Abb. 3.7). Auch waren die Pro- (CD43<sup>hoch</sup>B220<sup>+</sup>) und Pre-B-Zellen (CD43<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) in normalen Verhältnissen vorhanden. Beide Färbungen ließen jedoch vermuten, dass die rezirkulierenden B-Zellen (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>B220<sup>hoch</sup>CD43<sup>-</sup>) sowohl bei den (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre) als auch bei den (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD21cre)-Mäusen von 20-25% auf etwa 3-10% reduziert waren (Abb. 3.7, 3.8). Um dies zu überprüfen, wurde eine weitere Färbung mit  $\alpha$ -IgM- und  $\alpha$ -IgD-Antikörpern durchgeführt. Diese Färbung bestätigte, dass der prozentuale Anteil der reifen B-Zellen (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) im Vergleich zu den unreifen (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) stark reduziert ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die frühe B-Zellentwicklung durch die Expression von LMP1/CD40 nicht beeinflusst wird, jedoch LMP1/CD40-exprimierende reife B-Zellen nicht mehr aus der Peripherie in das Knochenmark zurückkehren können.



**Abbildung 3.8 Die Expression von LMP1/CD40 in B-Zellen verhindert die Rezirkulation der reifen B-Zellen ins Knochenmark**

(A) FACS-Analysen von Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks (KM) von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre) (LMP1/CD40//CD19cre) und (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD21cre)-Mäusen (LMP1/CD40//CD21cre) und entsprechenden Kontrollmäusen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>; CD21cre<sup>+/-</sup>). Diese wurden mit  $\alpha$ -IgM-Antikörpern und  $\alpha$ -IgD-Antikörpern gefärbt und mittels FACS-Analysen untersucht. In den gezeigten FACS-Blots sind nur Zellen dargestellt die im FACS B220+ sind. Die Prozente zeigen den Anteil der reifen rezirkulierenden B-Zellen (R) (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) und der unreifen B-Zellen (U) (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>). Die ersten beiden und die letzten beiden FACS-Blots je Reihe zeigen zeitgleich angefertigte Analysen.

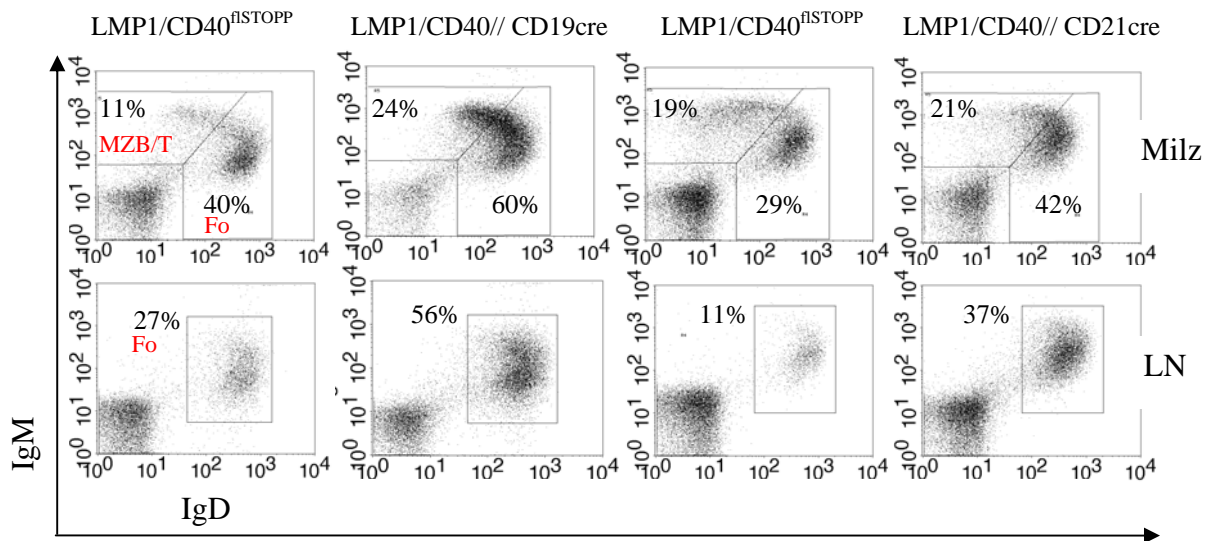
### 3.1.5 Die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 führt zu einer Vermehrung von follikulären und Marginalzonen- B-Zellen

Da die Anzahl der B-Zellen in der Milz und in den Lymphknoten stark erhöht war (Abb. 3.6), stellte sich die Frage, ob die verschiedenen B-Zellpopulationen in äquivalentem Maße daran beteiligt sind, oder möglicherweise nur eine bestimmte Zellpopulation expandiert ist.

Für die Klärung dieser Frage wurden zunächst Einzelzellsuspensionen von Milz und Lymphknoten mit Antikörpern gegen IgM, IgD und B220 gefärbt und anschließend durch FACS-Analysen untersucht.

Diese Färbungen zeigten, dass die expandierte B-Zellpopulation sowohl IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> follikuläre B-Zellen (FO-Zellen) als auch IgM<sup>hoch</sup>IgD<sup>niedrig</sup> transitionale- und Marginalzonen-B-Zellen (MZB-Zellen) beinhaltete (Abb. 3.9). In den Lymphknoten war der Anteil der FoB-Zellen (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>), die den Hauptanteil der B-Zellen in den Lymphknoten ausmachen, im Vergleich zu anderen Zellen des Lymphknotens ebenfalls erhöht.

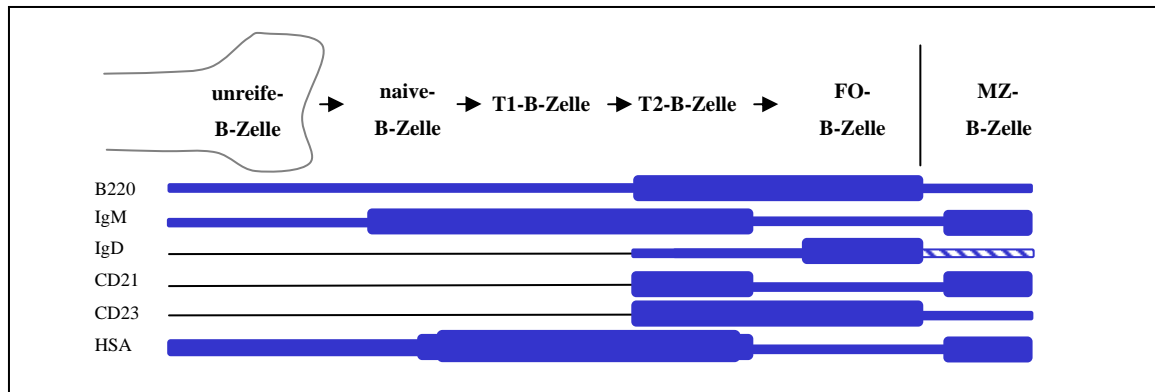




**Abbildung 3.9 Durchflusszytometrische Analysen (FACS) von Einzelzellen der Milz und der inguinalen Lymphknoten (LN) LMP1/CD40-exprimierender Mäuse**

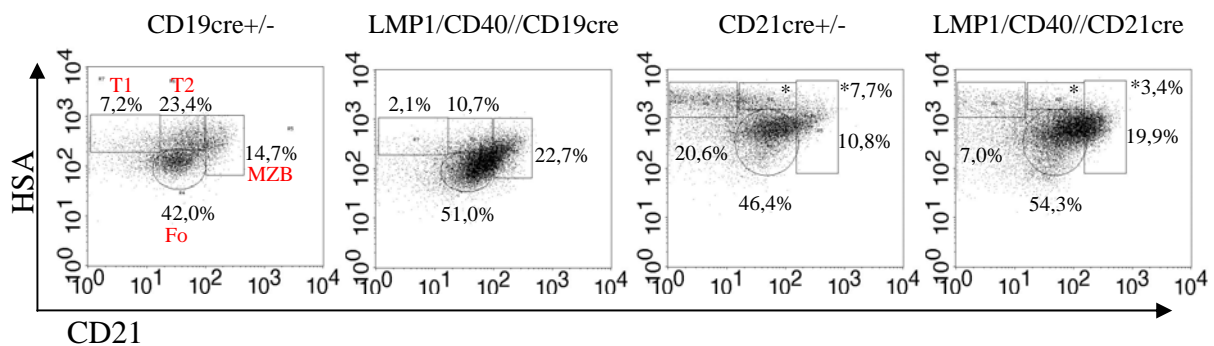
(A) Lymphozyten der Milz und der Lymphknoten, von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> × CD19cre)-Mäusen (LMP1/CD40//CD19cre) und (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> × CD21cre)-Mäusen (LMP1/CD40//CD21cre) und entsprechenden Kontrollen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>), wurden in Hinblick auf ihre IgM- und IgD- Expression nach Färbung mit spezifischen Antikörpern mittels FACS-Analysen untersucht. Die Prozentzahlen geben in der Milz den Anteil der (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) follikulären B-Zellen, sowie der (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-/+</sup>) transitionalen und Marginalzonen-B-Zellen an. In den LN ist der Prozentsatz der (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) follikulären B-Zellen (FO) angegeben. Die ersten beiden und die letzten beiden FACS-Blots je Reihe zeigen zeitgleich angefertigte Analysen.

Um die in der Milz expandierten B-Zellpopulationen näher zu charakterisieren, wurden weitere Färbungen durchgeführt. Bei den B-Zellen der Milz unterscheidet man FoB-Zellen, MZB-Zellen und transitionale B-Zellen (T-B-Zellen). Die transitionalen B-Zellen aus denen sich MZB und FoB-Zellen entwickeln können, werden wiederum in transitionale-Typ1-B-Zellen (T1-B-Zelle) und Typ2-B-Zellen (T2-B-Zelle) unterteilt (Loder et al., 1999). Bei den T1-B-Zellen, die durch ein IgM<sup>hoch</sup>IgD<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup>CD23<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>HSA<sup>hoch</sup> Expressionsmuster gekennzeichnet sind, handelt es sich um frisch aus dem Knochenmark ausgewanderte B-Zellen, die sich zu T2-B-Zellen weiter entwickeln (Abb. 3.10). Diese T2-B-Zellen die IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>HSA<sup>hoch</sup> sind, können zu FoB-Zellen oder MZB-Zellen differenzieren. Die FoB-Zellen, die die zahlenmäßig größte B-Zellpopulation der Milz bilden, können durch die etwas geringere Expression von HSA (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>HSA<sup>+</sup>) von T2-B-Zellen unterschieden werden. Die MZB-Zellen liegen außerhalb des Marginalen-Sinus, einer Makrophagen-reichen Region, die den Follikel umgibt und sind durch die Expression der Oberflächenmarker CD21<sup>+</sup>CD23<sup>hoch</sup>IgM<sup>hoch</sup>IgD<sup>niedrig</sup> zu erkennen.



**Abbildung 3.10 Expressionsstärke von Oberflächenmarker auf B-Zellen der Peripherie**

Mit einer B220/HSA/CD21-Färbung wurden die relativen Anteile der unreifen T-B-Zellen zu den reifen folliculären und Marginalzonen-B-Zellen bestimmt. Wie in Abbildung 3.11 zu sehen ist, waren in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen T-B-Zellen im Vergleich zu den reifen B-Zellen (FO-Zellen und MZB-Zellen) verringert. Die T1-B-Zellen ( $\text{HSA}^{\text{hoch}}\text{CD21}^- \text{B220}^+$ ) waren etwa um das Dreifache und die T2-B-Zellen ( $\text{HSA}^{\text{hoch}}\text{CD21}^+ \text{B220}^+$ ) etwa um das Zweifache verringert (Abb. 3.11). Bei den reifen B-Zellen war sowohl der Anteil der folliculären ( $\text{HSA}^+ \text{CD21}^+ \text{B220}^+$ ) als auch der Marginalzonen-B-Zellen ( $\text{HSA}^{\text{hoch}} \text{CD21}^{\text{hoch}} \text{B220}^+$ ) erhöht.



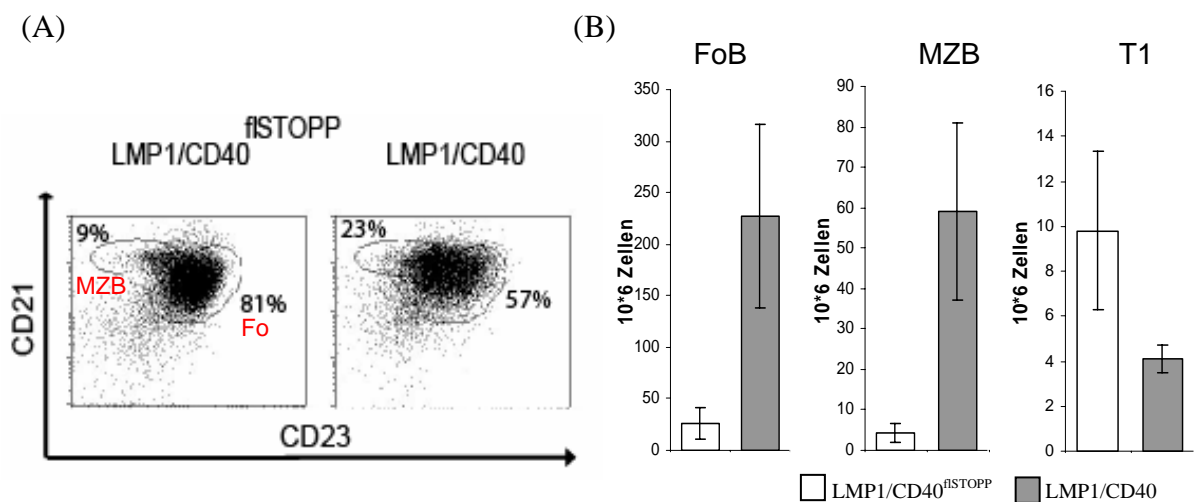
**Abbildung 3.11 Die Expression von LMP1/CD40 in B-Zellen führt zu einer Expansion der FoB- und MZB-Zellen**

Lymphozyten der Milz von ( $\text{LMP1/CD40}^{\text{flSTOPP}} \times \text{CD19cre}$ )- und ( $\text{LMP1/CD40}^{\text{flSTOPP}} \times \text{CD21cre}$ )-Mäusen ( $\text{LMP1/CD40//CD19cre}$ ;  $\text{LMP1/CD40//CD21cre}$ ) und Kontrollen ( $\text{CD19cre+/-}$ ;  $\text{CD21cre+/-}$ ) wurden in Hinblick auf ihre HSA, CD21 und B220 Expression mittels FACS-Analysen untersucht. Die FACS-Analysen zeigen nur Zellen die im FACS positiv für den B-Zell-Marker B220 waren. Der Anteil der T1-B- ( $\text{HSA}^{\text{hoch}}\text{CD21}^- \text{B220}^+$ ), T2-B- ( $\text{HSA}^{\text{hoch}}\text{CD21}^+ \text{B220}^+$ ), MZB- ( $\text{HSA}^{\text{hoch}}\text{CD21}^{\text{hoch}} \text{B220}^+$ ) und FoB-B-Zellen (FO) ( $\text{HSA}^+ \text{CD21}^+ \text{B220}^+$ ) ist in den FACS-Blots markiert.

Um die prozentualen Anteile der FoB- und MZB-Zellen besser bestimmen zu können, wurden Milzlymphozyten mit  $\alpha$ -B220-,  $\alpha$ -CD21- und  $\alpha$ -CD23-Antikörpern gefärbt und im FACS

analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die MZB-Zellen ( $CD21^{\text{hoch}}CD23^{\text{niedrig}}B220^+$ ) in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen anteilmäßig mehr zunehmen als die FoB-Zellen ( $CD21^+CD23^+B220^+$ ) (Abb. 3.12A).

Die Berechnung der Gesamtzellzahlen der einzelnen B-Zellpopulationen ergab, dass im Vergleich zu den Kontrollen die Zellzahl der FoB-Zellen um das Achtfache und die der MZB-Zellen um das Zwölffache erhöht war. (Abb. 3.12B). Die Anzahl der transitionalen T1-B-Zellen war hingegen um etwa die Hälfte reduziert. Der Anteil der T2-B-Zellen konnte nicht bestimmt werden, da eine Trennung von den FoB-B-Zellen durch diese Färbung nicht möglich war.



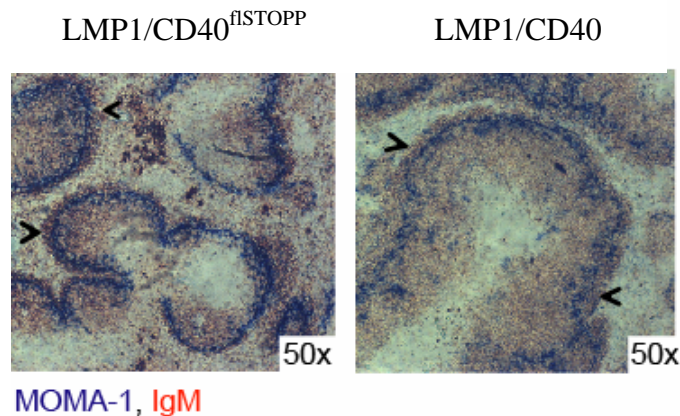
**Abbildung 3.12 In LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen ist die Gesamtzellzahl der folliculären und Marginalzonen-B-Zellen stark erhöht**

(A) FACS-Färbung von Milzzellen von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre<sup>+/-</sup>)-Mäusen (LMP1/CD40) und Kontrollmäusen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>) mit  $\alpha$ -CD21- und  $\alpha$ -CD23-Antikörpern MZB-Zellen kennzeichnen sich durch  $CD21^{\text{hoch}}CD23^-$  und folliculäre B-Zellen (Fo) durch  $CD21^+CD23^+$ . (B) Gesamtzellzahl der MZB-Zellen ( $B220^+CD21^{\text{hoch}}CD23^{\text{niedrig}}$ ), der folliculären B-Zellen (Fo) ( $B220^+CD21^+CD23^+$ ) und T1-B-Zellen ( $HSA^{\text{hoch}}CD21^-B220^+$ ) von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)- (LMP1/CD40) und LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> Mäusen. Zur Bestimmung der Anzahlen wurden die Anteile der Populationen durch Färbung der angegebenen Marker und anschließender FACS-Analyse bestimmt und auf die Gesamtzellzahl umgerechnet. Für die Bestimmung der Zellzahlen wurden je Gruppe mindestens 5 Mäuse berücksichtigt

Da die Anzahl der Marginalzonen-B-Zellen stark erhöht war, wurde in histologischen Schnitten untersucht, ob die gesamte Marginalzone vergrößert ist. Die Schnitte wurden mit  $\alpha$ -IgM- und  $\alpha$ -Moma1-Antikörpern gefärbt. Der Moma1 ist ein typischer Marker der metallophilen Makrophagen, die entlang des marginalen Sinus, der die folliculäre Zone von der Marginalzone trennt, angeordnet sind. Mit dem  $\alpha$ -IgM-Antikörper wurden die B-Zellen sichtbar gemacht. Die IgM positiven (rot) MZB-Zellen, die sich außerhalb des hier durch



$\alpha$ -Moma1-Antikörper gefärbten Marginalen Sinus (blau) befinden, konnten in den LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen entlang des gesamten Follikelrandes nachgewiesen werden (Abb. 3.13). In den Schnitten scheint die MZB-Zell-Zone von LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen insgesamt leicht vergrößert zu sein.



**Abbildung 3.13 LMP1/CD40-exprimierende Mäuse haben eine definierte MZB-Zell-Zone, die entlang des gesamten Follikelrandes sichtbar ist**

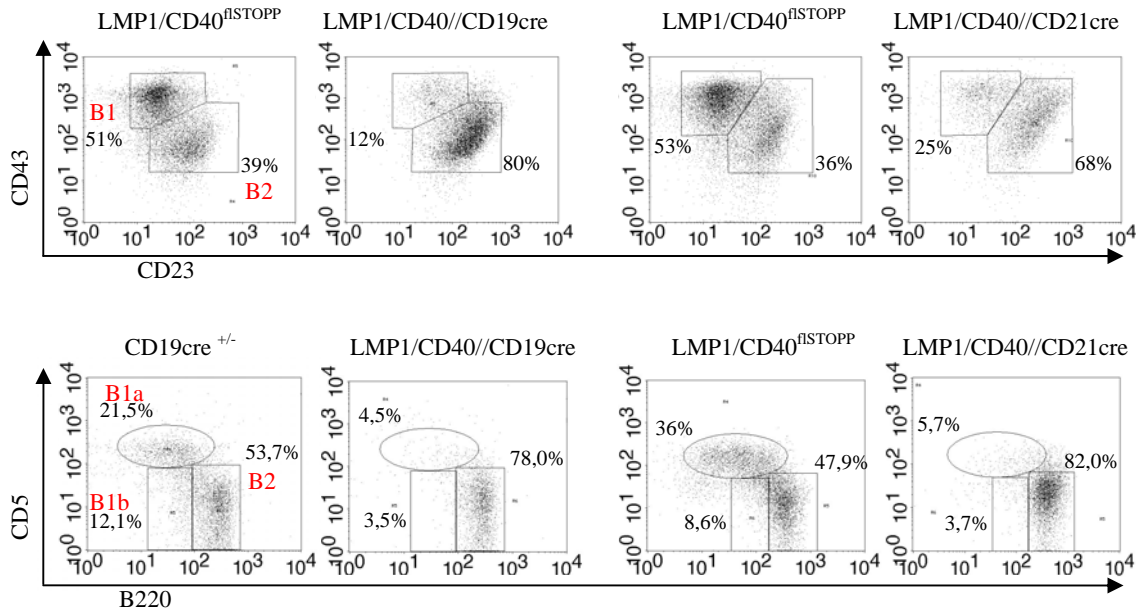
Gefrierschnitte der Milz von einer (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Maus (LMP1/CD40) und einer Kontrollmaus (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>). Die Schnitte wurden mit  $\alpha$ -MOMA1-Antikörpern in blau angefärbt und  $\alpha$ -IgM-Antikörpern in rot. MOMA1 ist ein typischer Marker der „metallophilen“ Makrophagen, die sich im marginalen Sinus der Follikel befinden. Die Pfeile kennzeichnen die MZB-Zellen. Vergrößerung 50-fach.

### ***3.1.6 Die Expression von LMP1/CD40 in B-Zellen führt zu einer Reduktion der B1-Zellen in der Peritonealhöhle***

Da gezeigt werden konnte, dass in der Milz und in den Lymphknoten von LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen die Population der B2-Zellen, zu denen follikuläre und MZB-Zellen gehören, deutlich expandieren, sollte untersucht werden, ob die LMP1/CD40-Expression auch zu einer Vergrößerung des B1-Zellpools führt. B1-Zellen befinden sich hauptsächlich in der Peritonealhöhle und können mit niedriger Affinität ein breites Spektrum an Antigenen binden. Sie reagieren meist auf körpereigene und bakterielle Antigene (Fagarasan et al., 2000). Man unterscheidet bei den B1-Zellen, die B1a- (B220<sup>niedrig</sup>CD43<sup>+</sup>CD23<sup>niedrig</sup>CD5<sup>+</sup>) und B1b-Zellen (B220<sup>niedrig</sup>CD43<sup>+</sup>CD23<sup>niedrig</sup>CD5<sup>niedrig</sup>).

Durch die Färbung mit  $\alpha$ -CD23- und  $\alpha$ -CD43-Antikörpern konnte gezeigt werden, dass der Anteil der B1-Zellen (CD43<sup>hoch</sup>CD23<sup>niedrig</sup>) stark reduziert war (Abb. 3.14 oben). Um die B1a- von den B1b-Zellen unterscheiden zu können, wurde eine weitere Färbung mit  $\alpha$ -CD5- und  $\alpha$ -B220-Antikörpern durchgeführt. Wie unten in der Abbildung 3.14 gezeigt, waren sowohl

die B1a-Zellen ( $B220^{\text{niedrig}}CD5^+$ ) als auch die B1b-Zellen ( $B220^{\text{niedrig}}CD5^{\text{niedrig}}$ ) reduziert. Die Reduktion der B1-Zellen zeigte sich sowohl in ( $LMP1/CD40^{\text{flSTOPP}} \times CD19^{\text{cre}}$ ) als auch in ( $LMP1/CD40^{\text{flSTOPP}} \times CD21^{\text{cre}}$ )-Mäusen.



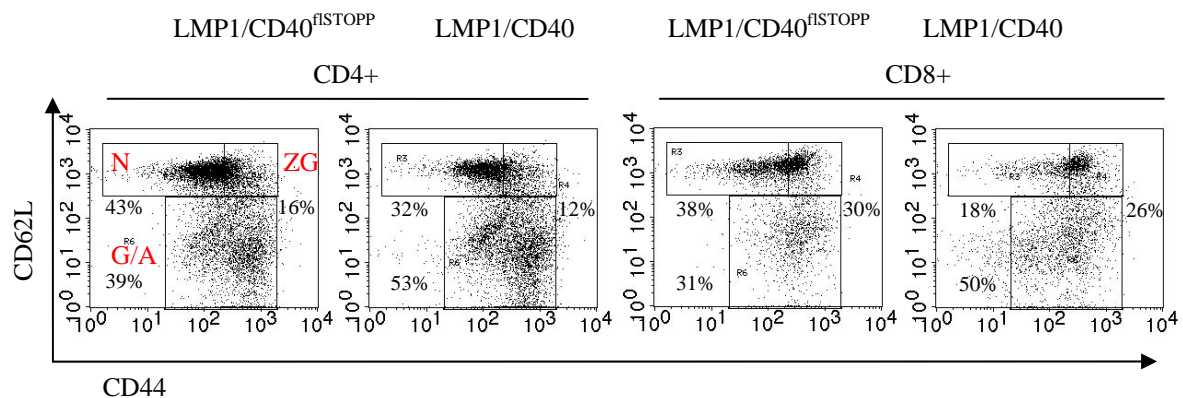
**Abbildung 3.14 In der Peritonealhöhle ist der Anteil der B1a- und B1b-Zellen stark vermindert**

FACS-Analyse der Lymphozyten der Peritonealhöhle einer ( $LMP1/CD40^{\text{flSTOPP}} \times CD19^{\text{cre}}$ )-Maus ( $LMP1/CD40//CD19^{\text{cre}}$ ), einer ( $LMP1/CD40^{\text{flSTOPP}} \times CD21^{\text{cre}}$ )-Maus ( $LMP1/CD40//CD21^{\text{cre}}$ ) sowie von Kontrollmäusen ( $LMP1/CD40^{\text{flSTOPP}}$ ;  $CD19^{\text{cre}}+/-$ ). Der Anteil der B1- und B2-Zellen der aus der Peritonealhöhle isolierten Lymphozyten wurde durch FACS-Analysen bestimmt. Im oberen Teil der Abbildung sind ausschließlich Zellen dargestellt die im FACS B220 positiv sind. Gekennzeichnet wurde der prozentuale Anteil der B1- ( $CD23^{\text{niedrig}}CD43^{\text{hoch}}$ ) und B2-Zellen ( $CD23^{\text{hoch}}CD43^{\text{niedrig}}$ ) and der dargestellten Population. Der untere Teil zeigt die prozentualen Anteile von B1a- ( $B220^{\text{niedrig}}CD5^+$ ), B1b- ( $B220^{\text{niedrig}}CD5^{\text{niedrig}}$ ) und B2-Zellen ( $B220^{\text{hoch}}CD5^+$ ). Die ersten beiden und die letzten beiden FACS-Blots je Reihe zeigen zeitgleich angefertigte Analysen.

### 3.1.7 Die peripheren T-Zellen zeigen in *LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen einen aktivierten Phänotyp*

Da die  $LMP1/CD40$ -Expression in B-Zellen zu einer erhöhten T-Zellzahl in der Milz führt (Abb. 3.6A), stellte sich die Frage, welche T-Zellpopulationen an dieser Expansion beteiligt sind. Die Lymphozyten der Milz wurden daher mit  $\alpha$ -CD4,  $\alpha$ -CD8,  $\alpha$ -CD62L und  $\alpha$ -CD44-Antikörpern gefärbt. Diese Färbung ermöglichte, die prozentualen Anteile der naiven-T-Zellen ( $CD62L^{\text{hoch}}CD44^{\text{niedrig}}$ ), der zentralen Gedächtnis-T-Zellen ( $CD62L^{\text{hoch}}CD44^{\text{hoch}}$ ) sowie

der Gedächtnis-T-Zellen ( $CD62L^{\text{niedrig}}CD44^{\text{hoch}}$ ) und der aktivierten Effektor-T-Zellen ( $CD62L^{\text{niedrig}}CD44^{\text{hoch}}$ ) innerhalb der CD4- und CD8-positiven Populationen zu bestimmen. Wie in Abbildung 3.15 gezeigt wird, war sowohl in der CD4-positiven als auch in der CD8-positiven Fraktion der Anteil der naiven-T-Zellen ( $CD62L^{\text{hoch}}CD44^{\text{niedrig}}$ ) und der zentralen-Gedächtnis-Zellen ( $CD62L^{\text{hoch}}CD44^{\text{hoch}}$ ) in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen leicht verringert. Im Gegensatz dazu war der Anteil der CD4+ und CD8+ Gedächtnis- ( $CD62L^{\text{niedrig}}CD44^{\text{hoch}}$ ) und der aktivierten Effektor-T-Zellen ( $CD62L^{\text{niedrig}}CD44^{\text{hoch}}$ ) erhöht.



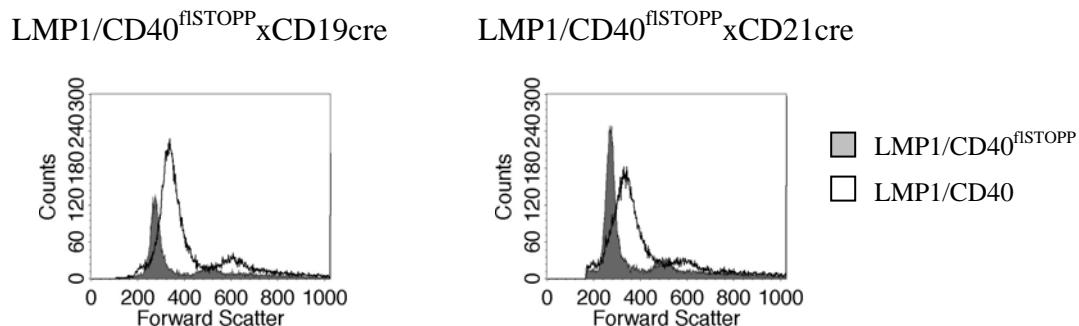
**Abbildung 3.15 Der Anteil der Gedächtnis-T-Zellen und aktivierten T-Zellen an der T-Zellpopulation der Milz ist erhöht**

Durchflusszytometrische (FACS)-Analysen der T-Lymphozyten der Milz von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre<sup>+/-</sup>)- (LMP1/CD40) und Kontrollmäusen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>). Einzelsuspensionen der Milz, wurden mit  $\alpha$ -CD4,  $\alpha$ -CD8,  $\alpha$ -CD44 und  $\alpha$ -CD62L-Antikörper durchgeführt. Die Prozentangaben zeigen den Anteil der naiven T-Zellen (N) ( $CD62L^{\text{hoch}}CD44^{\text{niedrig}}$ ), der zentralen Gedächtnis-T-Zellen (ZG) ( $CD62L^{\text{hoch}}CD44^{\text{hoch}}$ ) sowie zusammengefasst den Anteil der Gedächtnis-T-Zellen (G) ( $CD62L^{\text{niedrig}}CD44^{\text{hoch}}$ ) und aktivierten T-Zellen (A) ( $CD62L^{\text{niedrig}}CD44^{\text{hoch}}$ ).

### 3.1.8 LMP1/CD40-exprimierende B-Zellen zeigen einen aktivierten Phänotyp

Die Analysen der B-Zellpopulationen in den verschiedenen lymphatischen Organen zeigten, dass die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 zu einer Reduktion der B1-Zellen und zu einer starken Expansion der B2-Zellen führt. Es stellte sich die Frage, ob sich die LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen phänotypisch von den B-Zellen der Kontrollen unterscheiden. Da die B-Zellen LMP1-exprimierender Mäuse einen aktivierten Phänotyp zeigten, wurde überprüft, ob auch die LMP1/CD40-Expression zu einer Aktivierung der Zellen führt (Uchida et. al. 1999).

Es ist bekannt, dass aktivierte B-Zellen größer sind als ruhende B-Zellen (zu Übersicht Janeway et. al 2001). Aus diesem Grund wurde die Größe der Milz-B-Zellen mittels des „Forward Scatters“ im FACS bestimmt. Je höher der Wert des „Forward Scatters“ ist, umso größer sind die Zellen. Aus der Milz isolierte B-Zellen von LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen waren generell größer als die von Kontrollmäusen präparierten B-Zellen, was auf eine Aktivierung hindeutet (Abb. 3.16).

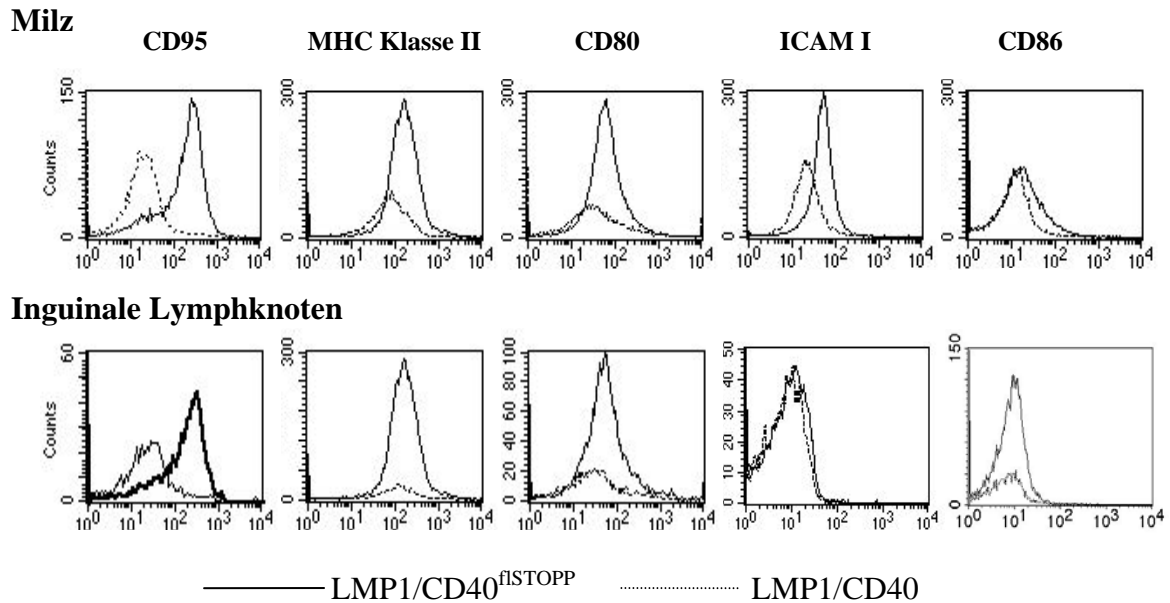


**Abbildung 3.16 LMP1/CD40-Expression führt zu einer Größenzunahme der B-Zellen**

FACS-Analyse der Milz-B-Zellen in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen (LMP1/CD40) und entsprechenden Kontrollen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>) der Züchtungen LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre und LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD21cre. Die Milzzellen wurden zunächst mit  $\alpha$ -B220-Antikörpern und TOPRO-3 gefärbt. In den Histogrammen sind die Zellen nach ihrer Größe im „Forward Scatter“ aufgetragen, die im FACS als lebende (TOPRO-3<sup>-</sup>) B-Zellen (B220<sup>+</sup>) identifiziert wurden.

CD40-Signale führen zu einer Induktion verschiedener Aktivierungsmarker und Adhäsionsmolekülen, wie z.B. MHC-Klasse II, CD80, CD86, CD95 und ICAM1. Deshalb wurde die Expressionsstärke dieser Proteine auf B-Zellen (B220<sup>+</sup>) LMP1/CD40-exprimierender Mäuse überprüft. Wie am Beispiel von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen ersichtlich, führte die Expression von LMP1/CD40 zu einer deutlich verstärkten Expression von CD95 und ICAM1 (Abb. 3.17). Die Expression von MHC-Klasse II sowie CD80 und CD86 waren leicht aber reproduzierbar erhöht.

Die Zunahme der Zellgröße und die verstärkte Expression von Aktivierungsmarkern und Zelladhäsionsmolekülen zeigten, dass sich die LMP1/CD40-exprimierenden Zellen in einem aktivierten Zustand befanden.



**Abbildung 3.17 Verschiedene Aktivierungsmarker werden durch LMP1/CD40-Expression induziert**

Lymphozyten der Milz und der inguinalen Lymphknoten wurden durch FACS-Analysen auf die Expression von B220 und den angegebenen Aktivierungs- und Adhäsionsmarker untersucht. Die Zellen stammen von altersgleichen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen (LMP1/CD40) und Kontrollmäusen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>). Die Histogramme zeigen eine Überlagerung der Expressionsstärke der jeweiligen Aktivierungsmarker der im FACS B220-positiven B-Zellen.

### ***3.1.9 Die LMP1/CD40-Expression in B-Zellen führt zur spontanen Proliferation und zum verlängerten Überleben der B-Zellen.***

Da die Anzahl der B-Zellen in der Milz von LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen stark erhöht war, stellte sich die Frage, wodurch die Vermehrung der Zellen verursacht wird. Die Zunahme der B-Zellzahlen könnte sowohl durch verlängertes Überleben als auch durch eine verstärkte Proliferation der B-Zellen hervorgerufen werden.

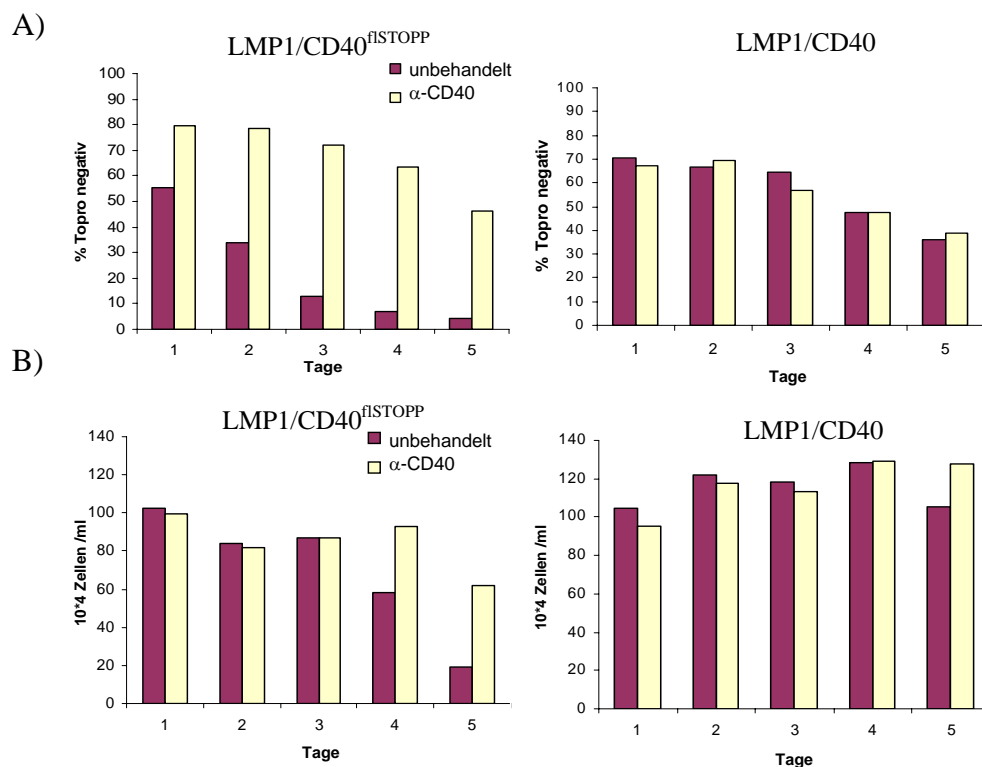
Aus *in vitro* Versuchen ist bekannt, dass die CD40-Stimulation in Kombination mit IL4, ruhende B-Zellen zur Proliferation anregen kann (Banchereau and Rousset, 1991). Daher wurde untersucht, ob die Expression von LMP1/CD40 eine Auswirkung auf die proliferativen Eigenschaften von B-Zellen hat. Aus Einzelzellsuspensionen der Milz von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen sowie entsprechenden Kontrollen wurden mittels MACS-Separation B-Zellen isoliert. Diese wurden anschließend mit Carboxy-fluoreszin-diacetat-succinimidyl-Ester (CFSE) markiert und 5 Tage kultiviert. CFSE ist ein Succinimidylester, der bei der Bindung an intrazelluläre Proteine zu einem fluoreszierenden Produkt umgesetzt wird. Bei einer Zellteilung wird CFSE gleichmäßig auf die Tochterzellen

verteilt, so dass die einzelnen Zellen nur noch halb so stark fluoreszieren. Auf diese Weise können mehrere Zellteilungen mit Hilfe von FACS-Analysen verfolgt werden. Die CFSE markierten Zellen wurden in Medium ohne Zusätze, mit IL4, mit agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern, oder auch mit einer Kombination von IL4 und agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern, kultiviert. Als Positivkontrolle wurden einige B-Zellen mit LPS oder einer Kombination von LPS und agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern stimuliert, was wie bereits bekannt ist zu einer starken Proliferation der B-Zellen führt.

Wie in Abbildung 3.19 zu sehen ist, hatten sich nach fünf Tagen 20,5% der ohne Zusätze kultivierten LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen geteilt. Bei Stimulation mit IL4 stieg ihr Anteil auf 28,3%. Eine Stimulation der Zellen mit IL4 und agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörper führte sogar in 31,4% der Zellen zu einer Teilung. In der Kontrolle hatten sich nach fünf Tagen nur 5,4% der Zellen geteilt und bei Zugabe von IL4 8,8%, also weit weniger als in den LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen. Durch die Zugabe von agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern teilten sich doppelt so viele Zellen wie ohne Zusätze. Wie erwartet zeigte sich in den Kontrollzellen erst nach Stimulation mit IL4 und agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern ein größerer Anteil (18,4%) von proliferierenden Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass LMP1/CD40-exprimierende Zellen zur spontanen Proliferation neigen.

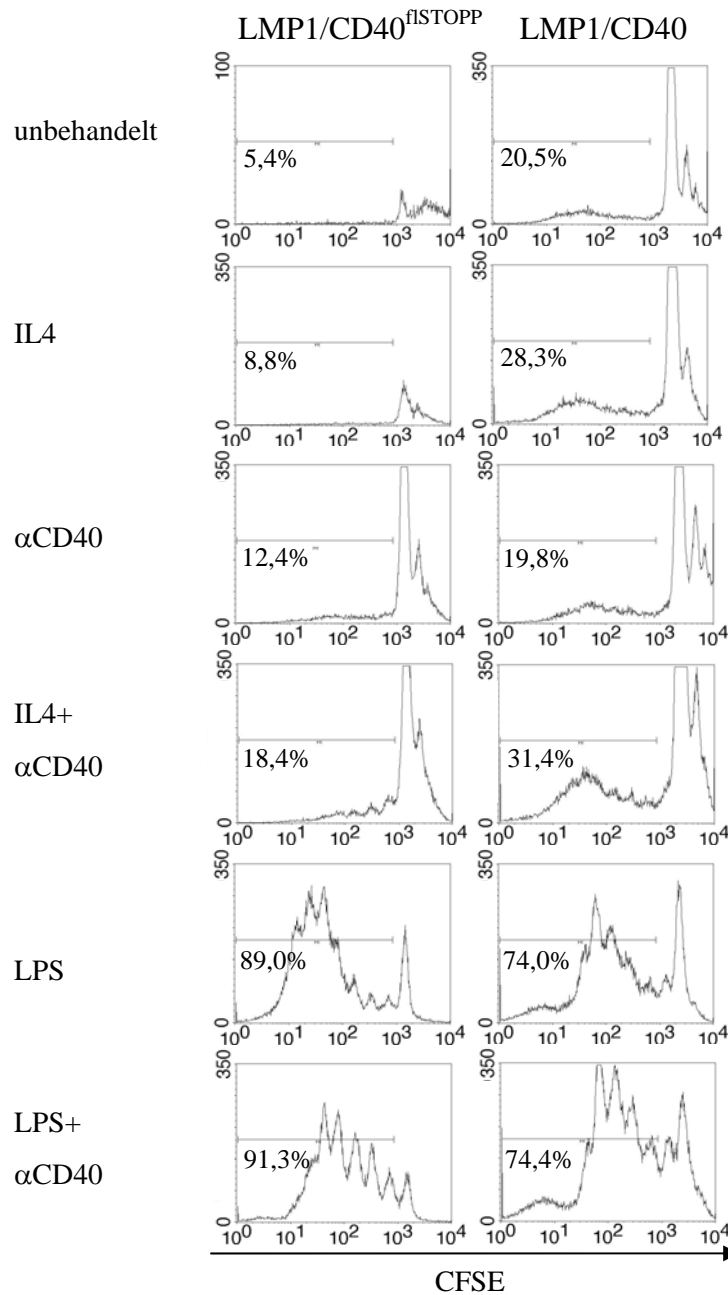
Um zu überprüfen, ob die LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen länger überleben können, wurden B-Zellen aus (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> x CD19cre)-Mäuse und entsprechenden Kontrollen durch MACS-Separation isoliert und anschließend in Medium mit oder ohne Zusatz von agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde dann im Abstand von 24 Stunden mit „TOPRO-3“, gefärbt und anschließend im FACS analysiert. Bei TOPRO-3 handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff, der an DNA von Zellen bindet. Da er von lebenden Zellen nicht aufgenommen wird, wird nur die DNA Toter Zellen angefärbt. Parallel wurde die Anzahl der Zellen in den Kulturen durch Zellzählung bestimmt. Es zeigte sich, dass bei Kontrollzellen, die ohne Zusatz von  $\alpha$ -CD40-Antikörper kultiviert worden waren, der Anteil der lebenden Zellen nach fünf Tagen auf 5% gesunken war (Abb. 3.18A). Bei Kultivierung der Kontrollzellen in Gegenwart von agonistische  $\alpha$ -CD40-Antikörpern konnten hingegen nach fünf Tagen noch über 40% lebende Zellen nachgewiesen werden. LMP1/CD40-exprimierende Zellen überlebten ähnlich lange wie die CD40-stimulierten Kontrollzellen, wobei die Stimulation des endogenen CD40 Rezeptor nahezu keinen weiteren positiven Effekt mehr auf das Überleben der Zellen hatte.

Diese Daten zeigen, dass LMP1/CD40-exprimierende Zellen wesentlich länger in Kultur überleben können als Wildtypzellen. Während die Gesamtzellzahl der Kontrollen innerhalb von 5 Tagen rapide sank, blieb diese bei LMP1/CD40-exprimierenden Zellen annähernd konstant (Abb. 3.18 B). Die Anzahl der LMP1/CD40-exprimierenden Zellen war nach fünf Tagen annähernd gleich und zeitweilig sogar gestiegen. Es ist daher davon auszugehen, dass an der Expansion der B2-B-Zellen in LMP1/CD40-exprimierenden Zellen sowohl eine vermehrte Proliferation als auch ein längeres Überleben der Zellen beteiligt ist.



**Abbildung 3.18 Primäre B-Zellen können durch die Expression von LMP1/CD40 länger in Kultur überleben als Kontrollzellen**

(A) B-Zellen der Milz aus (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen (LMP1/CD40) und Kontrollmäusen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>) wurden mittels MACS-Separation isoliert und für bis zu fünf Tage in Kultur gehalten. Ferner wurden sie mit (helle Balken) und ohne Zusatz (dunkle Balken) von agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der prozentuale Anteil der lebenden Zellen in Kultur, mittels TOPRO-3-Färbung und FACS-Analyse bestimmt. Da TOPRO-3 nur Tote Zellen färbt, sind die lebenden entsprechend TOPRO-3 negativ (B) Die Anzahl der lebenden Zellen in der unter A beschriebenen *in vitro* Kultur wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten durch Zellzählung bestimmt.



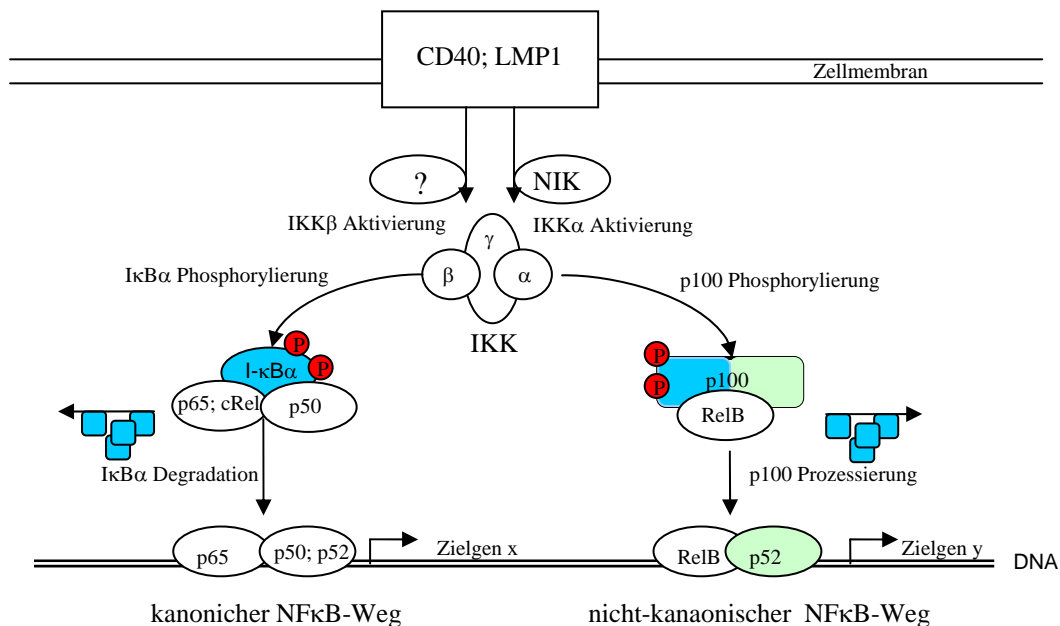
### Abbildung 3.19 LMP1/CD40-Expression induziert Proliferation

Milzzellen wurden aus (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> × CD19cre) (LMP1/CD40) und Kontrollmäusen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>) isoliert, B-Zellen durch Depletion von CD43 positiven Zellen gereinigt und mit CFSE gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden anschließend in Medium ohne Zusätze, mit agonistischen α-CD40-Antikörpern, mit IL4, mit IL4 und α-CD40-Antikörper, mit LPS oder mit LPS und α-CD40-Antikörper kultiviert. Die FACS-Analysen erfolgte 5 Tage nach dem Ansatz der Kultur. Die Histogramme zeigen nur lebende Zellen. Tote Zellen wurden durch Färbung mit TOPRO-3 detektiert und im FACS bei der Analyse ausgeschlossen. Da nur sehr wenige Wildtyp-B-Zellen in Medium ohne Zusätze länger als 3-4 Tage überleben, ist der Wert der Wildtyp-Zellen an Tag 5 entsprechend gering.



### 3.1.10 LMP1/CD40 aktiviert hauptsächlich den nicht-kanonischen NF $\kappa$ B-Signalweg

In LMP1-exprimierenden Mäusen wurde neben der Expression von Aktivierungsmarkern auch eine starke Aktivität des NF $\kappa$ B-Signalweges nachgewiesen (Uchida et al., 1999). Es ist bekannt, dass sowohl LMP1 als auch CD40 den kanonischen und den nicht-kanonischen NF $\kappa$ B-Weg aktivieren. Die Aktivität dieser beiden NF $\kappa$ B-Signalwege führt zur Freisetzung unterschiedlicher NF $\kappa$ B-Komponenten, die als Homo- oder Heterodimere in den Kern transloziert werden.



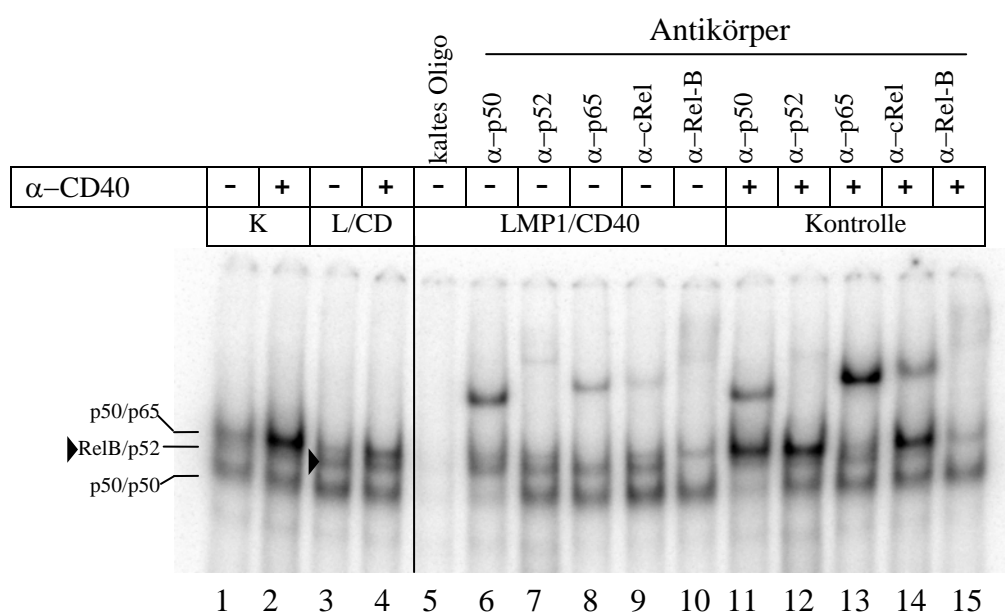
**Abbildung 3.20 Aktivierung des kanonischen und nicht-kanonischen NF $\kappa$ B-Signalweges durch LMP1 und CD40**

LMP1 und CD40 sind sowohl in der Lage den kanonischen als auch den nicht-kanonischen Signalweg zu aktivieren. Durch ein LMP1 oder CD40 Signal kommt es zunächst zu einer Aktivierung der Kinasen IKK $\alpha$ / $\beta$ . Im kanonischen Signalweg kommt es danach zu einer Phosphorylierung des Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  der anschließend ubiquitinyliert und dann degradiert wird. Dadurch werden die Komponenten des kanonischen NF $\kappa$ B-Signals p65 und p50 oder p52 freigesetzt, die anschließend als Homo oder Heterodimere in den Kern translozieren und Gene aktivieren. Im nicht-kanonischen Signalweg kommt es durch die Kinasen zur Phosphorylierung des Inhibitors p100. Danach wird der NF $\kappa$ B Faktor p52 von diesem Protein abgespalten und RelB freigesetzt. RelB und p52 können anschließend in den Kern translozieren, wo sie die Zielgene des nicht-kanonischen Signalweges aktivieren. Modell nach (Lam and Sugden, 2003; Pomerantz and Baltimore, 2002).

Zu dem kanonischen NF $\kappa$ B-Signalweg gehören die Proteine p50, p65(Rel-A) und c-Rel, die die Komplexe p65/p50 oder c-rel/p50 bilden. Die Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges führt zur Freisetzung von p52 und RelB, die als p52/RelB Heterodimere in den

Kern gehen. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche NFκB-Komponenten unterschiedliche Zielgene aktivieren (Abb. 3.20) (Pomerantz and Baltimore, 2002).

Um zu untersuchen, ob der aktivierte Phänotyp der LMP1/CD40-exprimierenden Zellen durch eine verstärkte NFκB-Aktivität zu erklären ist, wurden „Electro Mobility Shift Assays“ (EMSA) durchgeführt. Aus Einzelzellsuspensionen der Milz von LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen und entsprechenden Kontrollmäusen wurden durch Depletion aller CD43-positiven Zellen, B-Zellen isoliert und aus diesen Kernextrakte gewonnen. Vor der Kernextraktpräparation wurden die B-Zellen entweder eine Stunde in Medium ohne Zusätze oder in Medium mit agonistischen α-CD40-Antikörpern inkubiert.



**Abbildung 3.21 Durch LMP1/CD40-Expression wird der nicht-kanonische NFκB-Signalweg aktiviert**

Gelshift-Experiment mit Kernextrakten aus Milz-B-Zellen von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen (LMP1/CD40) und entsprechender Kontrollen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>), die durch Depletion der CD43+ Zellen aus der Milz isoliert wurden. Ein Teil der B-Zellen wurde vor der Isolation für eine Stunde mit agonistischen CD40-Antikörpern (α-CD40) *in vitro* stimuliert. Je Spur wurden 2μg B-Zell-Kernextrakt geladen. Als Sonde wurde ein 29bp langes Oligo mit einer NFκB-Bindestelle verwendet. Die einzelnen NFκB Komponenten wurden mit spezifischen Antikörpern gegen p50, p53, p65, Rel-B und cRel „super-geshiftet“ (Spuren 6-15). In der Abbildung wurde die Bande in der das Heterodimer Relb/p52, welche zu dem nicht-kanonischen Signalweg gehört, mit Pfeil markiert.

Entgegen jeder Erwartung war der kanonische NFκB-Signalweg in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen nicht aktiver als in den entsprechenden Kontrollmäusen. Dies

spiegelte sich in der Signalstärke des p50/p65- bzw. p50/c-Rel-Komplexes wieder (Abb.3.21 Spuren 3, 6, 8). Stattdessen bildete sich mit Kernextrakten von unstimulierten LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen ein Komplex, der RelB beinhaltet, und demzufolge eine Aktivierung des non-kanonischen NF $\kappa$ B-Signalweges widerspiegelte (Spur 3 (Pfeil); Shift Spur 10). Die Aktivierung des endogenen CD40-Rezeptors führte in Wildtyp-Zellen, wie erwartet zu einer starken Aktivierung des kanonischen NF $\kappa$ B-Signalwegs, was durch ein verstärktes Auftreten des p50/p65-Komplex (Spur 2, 11, 13) nachgewiesen werden konnte, und zur schwachen Aktivierung des nicht kanonischen Signalweges, wie durch die Bildung des p52/RelB-Komplexes gezeigt wurde (Spur 2, 12, 15). Im Gegensatz dazu führte die CD40-Stimulation LMP1/CD40-exprimierender Zellen nur zu einer schwachen Aktivierung des kanonischen NF $\kappa$ B-Weg jedoch nicht zu einer verstärkten Aktivierung der Komponenten des nicht-kanonischen Signalweges (Spur 4).

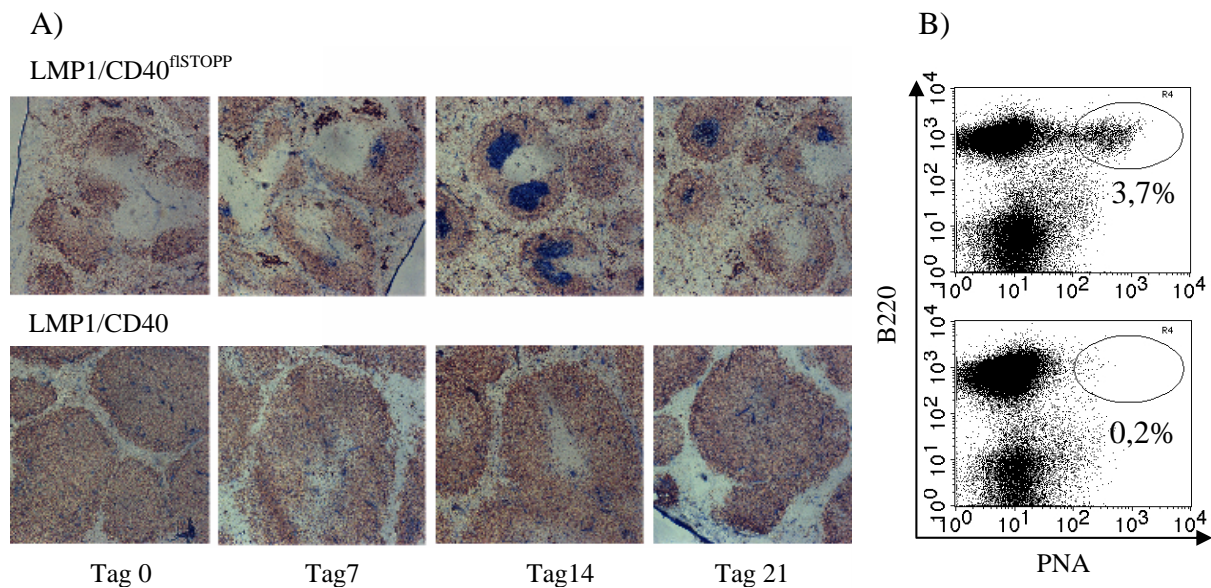
Diese Ergebnisse zeigen, dass sich das NF $\kappa$ B-Signal in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen von dem Signal unterscheidet, das durch die kurzfristige Aktivierung des CD40-Rezeptors in Wildtyp-Zellen hervorgerufen wird.

## **3.2 Einfluss eines konstitutiv aktiven CD40-Signals auf die T-Zell-abhängige Immunantwort von B-Zellen**

### ***3.2.1 LMP1/CD40-exprimierende Mäuse sind nach der Immunisierung mit T-Zell-spezifischem Antigen nicht in der Lage, Keimzentren in der Milz zu bilden***

Eine der zentralen Fragen war, ob ein konstitutives CD40-Signal wie LMP1 die Bildung von Keimzentren hemmt. Um dies zu untersuchen wurden LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre-Mäuse und entsprechende Kontrollmäuse mit dem an Hühner-Gammaglobulin konjugiertem Hapten Nitrophenylacetyl (NP<sub>17</sub>-CGG), das eine T-Zell-abhängige-Immunantwort (TD-Immunantwort) auslöst, immunisiert. Die Mäuse wurden sieben, vierzehn oder einundzwanzig Tage nach Immunisierung präpariert und Gefrierschnitte der Milz sowie der Lymphknoten angefertigt. Die Keimzentren wurden mit „peanut agglutinin“ (PNA), einem spezifischen Keimzentrumsmarker, angefärbt (Rose et al., 1980; Rose et al., 1981). Um die Struktur der Follikel besser erkennen zu können, wurden die B-Zellen zusätzlich mit  $\alpha$ -IgM-Antikörpern sichtbar gemacht. Während in den Kontrollen die meisten Keimzentren 14 Tage nach Immunisierung zu sehen waren, konnten in LMP1/CD40-exprimierende Mäusen zu

keinem Zeitpunkt die Bildung von Keimzentren nachgewiesen werden (Abb. 3.22A). Um zu überprüfen, ob sich im Gewebe der Milz LMP1/CD40-exprimierender Mäuse möglicherweise vereinzelt Keimzentrumszellen bilden konnten, die jedoch keine Keimzentrumsstrukturen bilden konnten, wurden aus der Milz von immunisierten Mäusen Einzelzellensuspensionen hergestellt und mittels FACS-Analysen auf PNA-positive Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass 14 Tage nach Immunisierung keine Keimzentrumszellen ( $B220^+PNA^+$ ) in den Milzen von LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen auftreten (Abb. 3.22B).



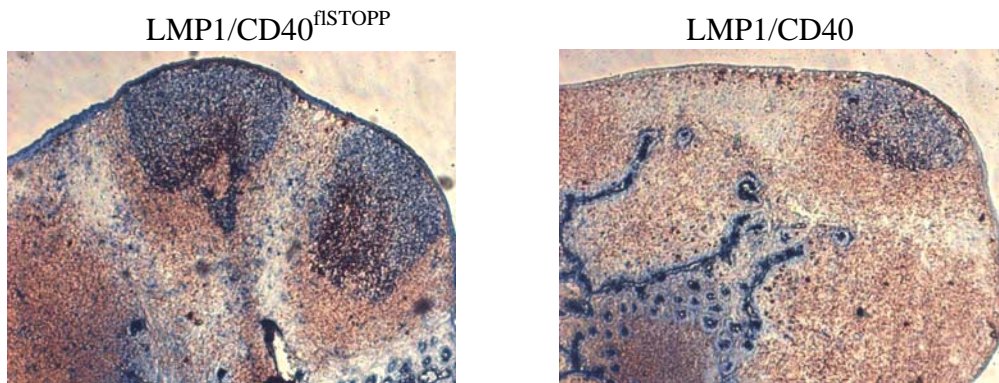
**Abbildung 3.22 LMP1/CD40-Expression verhindert die Bildung von Keimzentren nach T-Zell-abhängiger Immunisierung**

Gefrierschnitte der Milz von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)- (LMP1/CD40) oder Kontrollmäusen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>), die entweder nicht immunisiert oder 7, 14 oder 21 Tage nach Immunisierung mit 100µg NP<sub>16</sub>-CGG präpariert wurden. Die B-Zellen (rot) wurden in diesen Schnitten mit  $\alpha$ -IgM-Antikörpern und die Keimzentrumszellen mit PNA (blau) nachgewiesen. Für die FACS-Blots wurden Einzelzellensuspensionen der Milz der oben beschriebenen Mäuse verwendet, die 14 Tage zuvor mit 100µg NP<sub>16</sub>-CGG immunisiert worden waren.

### 3.2.2 Die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 hat keinen Einfluss auf die Keimzentrumbildung in Peyerschen Plaques

Die Peyerschen Plaques sind Bestandteil des Darm-assoziierten-Immunsystems, dessen Zellen ständig von Antigenen stimuliert werden, die mit der Nahrung aufgenommen werden oder von Darmbakterien stammen. Durch die andauernde Stimulation kommt es in den Peyerschen Plaques zu einer kontinuierlichen Bildung von Keimzentren, weshalb sie zu einem hohen Anteil aus Keimzentrumszellen bestehen. Es stellte sich die Frage, ob die Expression von

LMP1/CD40 in B-Zellen auch mit der Bildung der Keimzentren in Peyerschen Plaques interferiert. Daher wurden Gefrierschnitte der Peyerschen Plaques von LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen und von Kontrollmäusen hergestellt. Die Keimzentrumzellen wurden in den Schnitten mit PNA, und die B-Zellen mit  $\alpha$ -IgM-Antikörpern detektiert. Überraschenderweise konnten in den Peyerschen Plaques LMP1/CD40-exprimierender Mäuse, genau wie in den Kontrollen, Keimzentren, nachgewiesen werden (Abb. 3.23). In LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen waren diese jedoch durchschnittlich etwas kleiner.

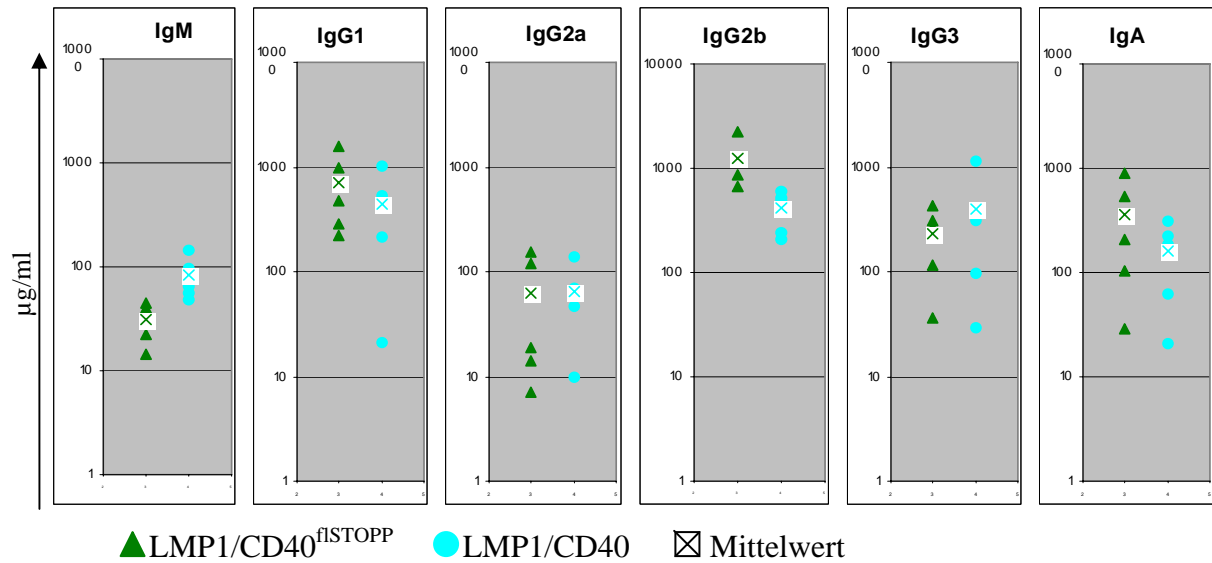


**Abbildung 3.23 Keimzentrumbildung in Peyerschen Plaques wird von der B-Zell-spezifischen Expression von LMP1/CD40 nicht beeinflusst**

Gefrierschnitte der Peyerschen Plaques einer (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup><sub>x</sub>CD19<sup>cre</sup>)-Maus (LMP1/CD40) und einer entsprechenden Kontrollmaus (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>). Die B-Zellen (rot) wurden in diesen Schnitten mit  $\alpha$ -IgM-Antikörpern und Keimzentrumzellen mit PNA (blau) nachgewiesen.

### ***3.2.3 LMP1/CD40-exprimierende Mäuse haben annähernd normale Antikörper Titer im Blut, sind aber nicht in der Lage nach Immunisierung spezifische Antikörper zu produzieren***

Die Antikörper Titer der verschiedenen Isotypen im Blut sind ein Indiz für den Zustand des Immunsystems. Man kann daran ablesen, inwieweit die B-Zellen in der Lage sind einen Klassenwechsel der Immunglobuline durchzuführen. Um die allgemeinen Antikörper-Titer und die Verteilung der Isotypen im Blut LMP1/CD40-exprimierender Mäuse zu bestimmen, wurden ELISA-Analysen, die für die unterschiedlichen Subklassen der Immunglobuline spezifisch sind, durchgeführt. Insgesamt konnten nur relativ geringe Unterschiede der Konzentrationen der verschiedenen Subklassen zwischen LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen und den Kontrollen detektiert werden (Abb. 3.24). Lediglich der IgM Spiegel war in Mäusen, die LMP1/CD40 exprimierten leicht erhöht, während die Mengen von IgG2b sowie IgA leicht verringert waren. Die Menge der IgG1-, IgG2a- und IgE-Antikörper im Serum war annähernd identisch.



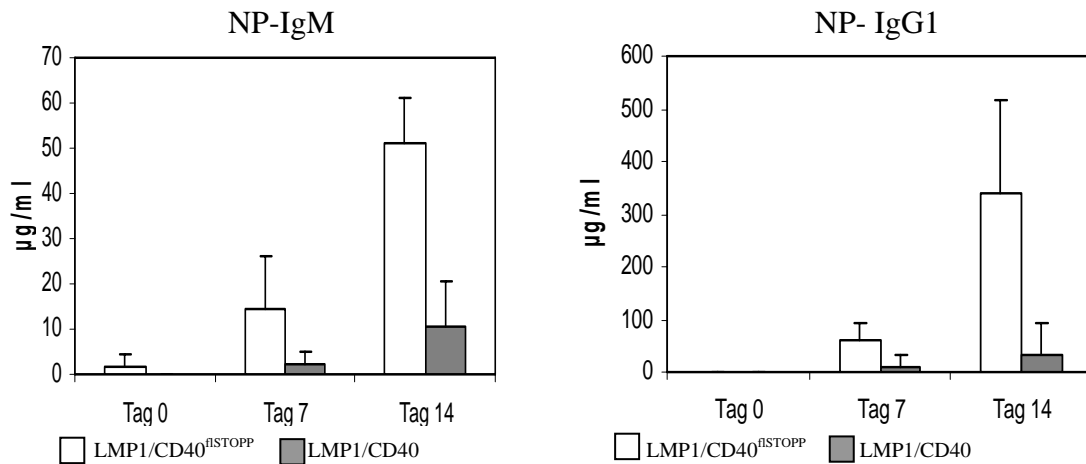
**Abbildung 3.24 Die Immunglobulin-Spiegel im Blutserum LMP/CD40-exprimierender Mäuse sind nur leicht verändert**

Die Abbildung zeigt die allgemeinen Konzentration der Immunglobuline im Serum nicht immunisierter (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäuse (LMP1/CD40) und von Kontrollmäusen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>). Je Gruppe wurden die Seren von mindestens fünf verschiedenen Mäusen analysiert.

Durch die Bestimmung der Titer spezifischer Antikörper kann untersucht werden, inwieweit das Immunsystem in der Lage ist, auf spezifische Antigene zu reagieren. Da das CD40 Signal eine besondere Rolle in der T-Zell-abhängigen Immunantwort der B-Zellen spielt, wurden Mäuse mit T-Zell abhängigem Antigen immunisiert. Nach Immunisierung kommt es zunächst zur Bildung niederaffiner Antikörper, die von Plasmazellen sezerniert werden, die bei der extrafollikulären Plasmazelldifferenzierung entstanden sind. Nach sieben bis vierzehn Tagen finden sich hochaffine Antikörper im Serum. Diese stammen von Plasmazellen, deren Vorläufer durch die Keimzentrumsreaktion gegangen sind.

Um zu überprüfen, ob LMP1/CD40-exprimierende Mäuse in der Lage sind, nach der Immunisierung mit T-Zell-abhängigem Antigen (TD-Antigen) (NP<sub>16</sub>-CGG), eine Immunantwort durchzuführen, wurde 7 und 14 Tage nach Immunisierung die Mengen NP-spezifischer Antikörper durch ELISA-Analysen gemessen. Sowohl 7 als auch 14 Tage nach der Immunisierung wurden in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen wesentlich weniger niederaffine NP-spezifische IgM und IgG1-Antikörper nachgewiesen werden, als in den Kontrollen (Abb. 3.25).



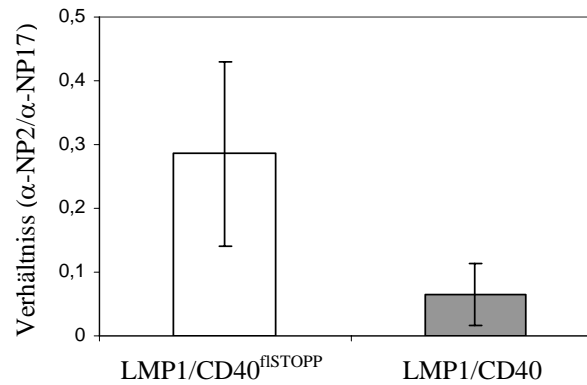


**Abbildung 3.25 LMP1/CD40 exprimierende Mäuse bilden wesentlich weniger NP-spezifische Antikörper nach Immunisierung mit NP16-CGG als entsprechende Kontrollen**

Serumtiter der NP-spezifischen IgM- und IgG1-Antikörper in (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> × CD19cre)-Mäusen (LMP1/CD40) und in Kontrollmäusen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>), vor Immunisierung (Tag 0) und jeweils 7 und 14 Tage nach Immunisierung mit 100 µg NP<sub>16</sub>-CGG.

Es stellte sich die Frage, ob es sich bei den gebildeten NP-spezifischen-Antikörpern um hoch- oder niederaffine Antikörper handelt. Während niederaffine Antikörper keimzentrumsunabhängig gebildet werden, ist die Bildung hochaffiner Antikörper direkt von der Keimzentrumsreaktion abhängig. Obwohl in der Milz LMP1/CD40-exprimierender Mäuse keine Keimzentren nachzuweisen waren, ist es trotzdem möglich, dass in den Lymphknoten oder außerhalb von Keimzentrumsstrukturen Plasmazellen entstanden sind, die hochaffine Antikörper sezernieren. Daher wurde in den Blutseren von LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen und den entsprechenden Kontrollen das Verhältnis der hochaffinen zu den niederaffinen Antikörpern überprüft.

In den Seren von LMP1/CD40-Mäusen war ein wesentlich geringerer Anteil der NP-spezifischen Antikörper hochaffin als in den Kontrollen (Abb. 3.26). Daraus lässt sich schließen, dass in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen nach T-Zell-abhängiger Immunisierung keine Keimzentrumsreifung der B-Zellen erfolgt und daher keine Plasmazellen gebildet werden können, die hochaffinen Antikörper sezernieren.



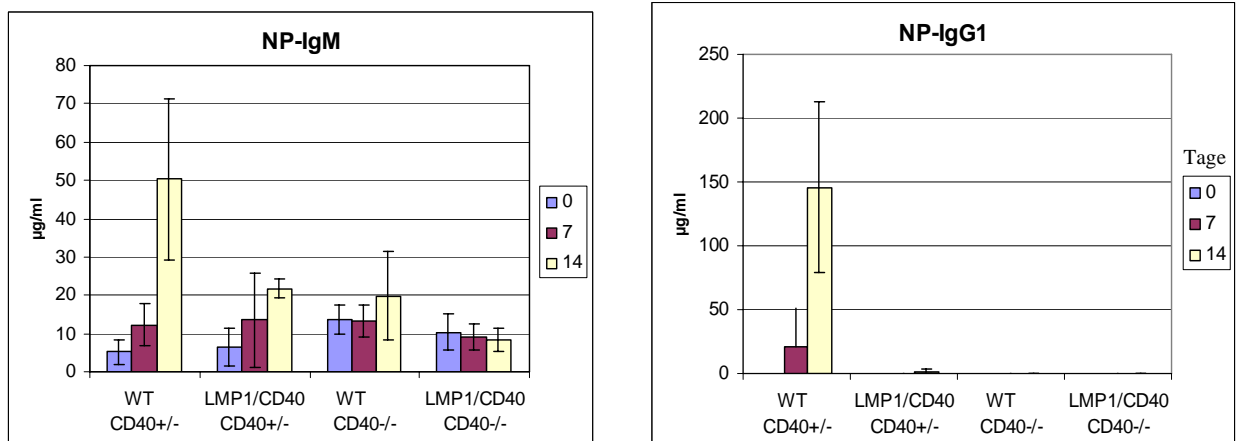
**Abbildung 3.26 Der Anteil der Hochaffinen-Antikörper im Blut LMP1/CD40 exprimierender Mäuse ist wesentlich geringer als bei Wildtypmäusen**

Dargestellt ist das Verhältnis der hochaffinen-NP-spezifischen IgG1 Antikörper zu den niederaffinen Antikörpern. Dazu wurde die Menge der Antikörper die an 17fach gekoppeltes NP binden (NP17), was sowohl nieder als auch hochaffine-NP-Antikörper können, mit der Menge der Antikörper verglichen, die in den gleichen Seren in der Lage waren an zweifach gekoppeltes NP zu binden (NP2) und daher als hochaffin bezeichnet werden. Um die Mittelwerte der Anteile der hochaffinen- an den affinen Antikörpern zu ermitteln, wurden die ELISA-Werte der Seren von mindestens fünf (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen (LMP1/CD40) und Kontrollmäusen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>), 14 Tage nach Immunisierung mit 100µg NP<sub>16</sub>-CGG ausgewertet.

### ***3.2.4 LMP1/CD40-Expression kann in CD40-defizienten Mäusen keinen Klassenwechsel rekonstituieren***

CD40-defiziente Mäuse können nicht auf T-Zell-abhängige Antigene antworten. In ihnen findet keine Keimzentrumsreaktion und kein Klassenwechsel statt, wodurch sie sehr viel IgM aber nur geringe Mengen anderer Immunglobuline im Blutserum haben (Castigli et al., 1994; Ferrari et al., 2001; Kawabe et al., 1994). Durch die Expression von LMP1 in CD40-defizienten Mäusen konnte der extrafollikuläre Klassenwechsel von IgM zu IgG1 rekonstituiert werden, was zur Sezernierung niederaffiner IgG1-Antikörper führte (Uchida et al., 1999). Es stellte sich die Frage, ob der Klassenwechsel in CD40-defizienten Mäusen durch LMP1/CD40 genau wie durch LMP1 wiederhergestellt werden kann. Um dies nachzuprüfen, wurden LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> Mäuse mit CD40-defizienten (-/-) Mäusen und CD19cre Mäusen gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzung wurden mit NP<sub>16</sub>-CGG immunisiert und nach sieben und 14 Tagen die Konzentrationen NP-spezifischer IgM- und IgG1-Antikörper im Blutserum bestimmt.

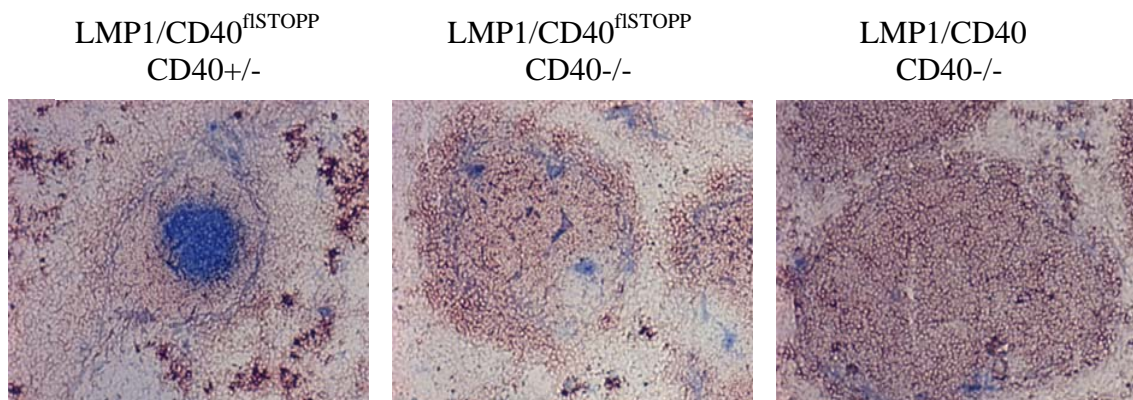




**Abbildung 3.27 Konzentrationen NP-spezifischer Antikörper im Blutserum CD40-defizienter Mäuse, die LMP1/CD40 B-Zell-spezifisch exprimieren**

Serumtiter der NP-spezifischen IgM- und IgG1-Antikörper in (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup><sub>x</sub> CD19cre)-Mäusen (LMP1/CD40) und der Kontrollen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>) mit (CD40<sup>+/+</sup>) und ohne (CD40<sup>-/-</sup>) CD40-Rezeptor, vor Immunisierung und jeweils 7 und 14 Tage nach Immunisierung mit 100µg NP<sub>16</sub>-CGG. Je Gruppe wurden drei Mäuse analysiert.

LMP1/CD40-exprimierende Mäuse, die CD40-defizient waren, produzierten weniger  $\alpha$ -NP-spezifische-IgM-Antikörper als LMP1/CD40-exprimierende Mäuse, die den endogenen CD40-Rezeptor exprimierten (Abb. 3.27).  $\alpha$ -NP-spezifische-IgG1-Antikörper waren in CD40-defizienten Mäusen unabhängig davon, ob sie LMP1/CD40 exprimierten oder nicht, nicht nachweisbar. Auch die Bildung von PNA-positiven Keimzentren blieb in CD40-defizienten Mäusen mit und ohne LMP1/CD40-Expression aus (Abb. 3.28).



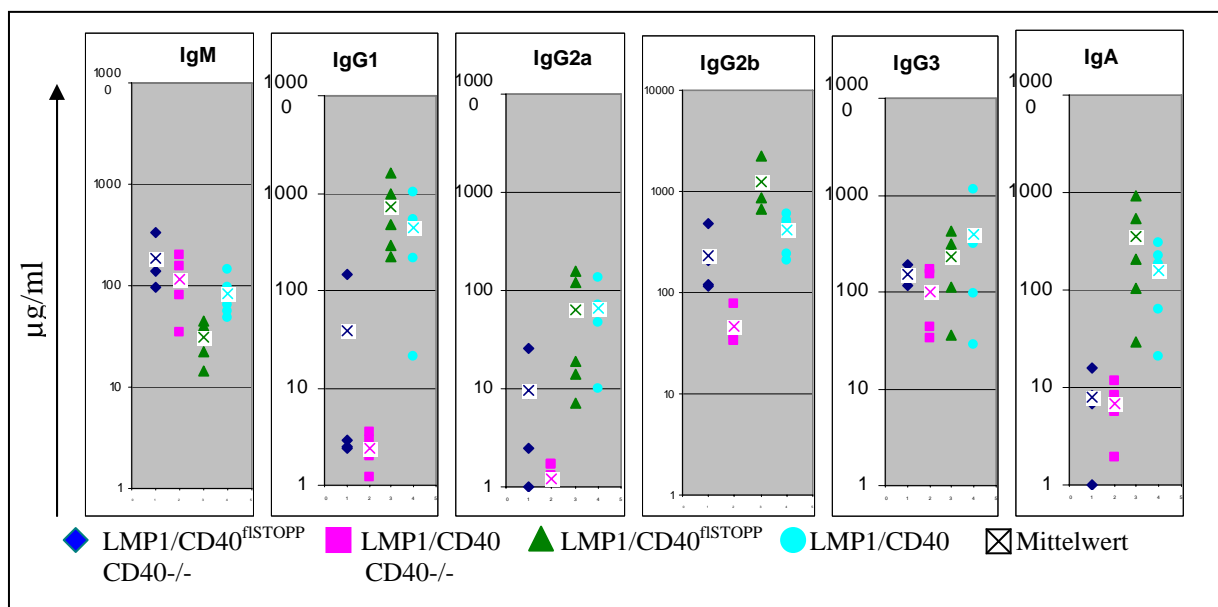
**Abbildung 3.28 Die B-Zell-spezifische LMP1/CD40-Expression führt in CD40-defizienten Mäusen nach TD-Immunisierung nicht zu der Bildung von Keimzentren**

Gefrierschnitte der Milzen (LMP1/CD40<sub>x</sub>CD19cre)-Mäuse (LMP1/CD40) und entsprechender Kontrollmäuse (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>) mit (CD40<sup>+/+</sup>) und ohne (CD40<sup>-/-</sup>) endogenen CD40-Rezeptor. Die Mäuse wurden 14 Tage nach Immunisierung mit 100µg NP<sub>16</sub>-CGG präpariert und die danach angefertigten Schnitte mit  $\alpha$ -IgM-Antikörpern (rot) PNA (blau) gefärbt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass B-Zellen, die LMP1/CD40 exprimieren und keinen endogenen CD40-Rezeptor besitzen, nicht auf Antigene reagieren können die eine T-Zell-abhängige Immunantwort induzieren. Das steht im Gegensatz zu der Fähigkeit von LMP1, den extrafollikulären Klassenwechsel nach TD-abhängiger Immunisierung zu induzieren.

Um zu untersuchen, ob die LMP1/CD40-Expression Klassenwechsel in CD40-defizienten Mäusen generell nicht wieder herstellen kann, wurden die Konzentrationen der unterschiedlichen Immunglobulin-Isotypen in den Seren von nicht immunisierten Mäusen mittels ELISA untersucht. (Abb. 3. 29). Es ist bekannt, dass CD40-defiziente Mäuse erhöhte IgM-Spiegel im Blut haben. Auch LMP1/CD40-exprimierende Mäuse zeigten unabhängig davon, ob sie CD40-defizient waren oder nicht, diesen Phänotyp. Die Mengen aller anderen Isotypen waren bis auf IgG3 in allen CD40-defizienten Mäusen stark reduziert. Die Expression von LMP1/CD40 führte in der Regel zu einer zusätzlichen Senkung der Immunglobulin-Konzentrationen.

Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass das von LMP1/CD40 ausgehende konstitutive CD40-Signal allein nicht ausreicht, um Klassenwechsel in CD40-defizienten Mäusen zu induzieren. Tendentiell scheint die LMP1/CD40-Expression in CD40 defizienten Mäusen sogar zu einer weiteren Reduktion der IgG1-, IgG2a- und IgG2b-Antikörper zu führen.



**Abbildung 3.29 Seruntiter der unterschiedlichen Immunglobulin-Isotypen in CD40-defizienten Mäusen mit und ohne LMP1/CD40-Expression**

Die Konzentrationen der verschiedenen Isotypen der Immunglobuline von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> x CD19cre)-Mäusen (LMP1/CD40) und Kontrollen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>) mit funktionellem CD40 oder ohne funktionellen (CD40<sup>-/-</sup>) CD40-Rezeptor wurden mittels ELISA bestimmt. Pro Gruppe wurden die Seren von 4 bis 5 Mäusen untersucht.

### **3.3 LMP1/CD40-Expression führt zu der Entstehung von Lymphomen**

#### ***3.3.1 Lymphoproliferative Erkrankungen in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen***

Mäuse, die LMP1 B-Zell-spezifisch exprimieren, entwickeln im Alter von 12-18 Monaten mit einer 32%igen Wahrscheinlichkeit Lymphome. Bei Mäusen über 18 Monaten liegt die Wahrscheinlichkeit sogar bei 42% (Kulwichit 1998). Es ist jedoch unklar, ob die Transformation der Zellen durch die LMP1-Signalaktivität an sich oder vorallem durch das konstitutive Signal ausgelöst wird. Da die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 bereits in jungen Mäusen zu einer Expansion des B- und T-Zell-Pools führte, wurden einige dieser Mäuse über längere Zeit beobachtet.

In einem Alter zwischen 12 und 18 Monaten entwickelte ein hoher Prozentsatz LMP1/CD40-exprimierender Mäuse Anzeichen starker lymphoproliferativer Erkrankungen. Bisher sind 9 von insgesamt 28 LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen, die ein Alter zwischen 12 und 18 Monaten erreicht haben, erkrankt, was einer Häufigkeit von 31% entspricht. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der LMP1/CD40-exprimierenden Mäuse mit den Kontrollen zu gewährleisten, wurde parallel zu jeder LMP1/CD40-exprimierenden Maus eine gleichaltrige Kontrolle gehalten. Bisher entwickelte keine der Kontrollmäuse eine lymphoproliferative Erkrankung.

Bei den in Tabelle 1 aufgeführten Mäusen handelt es sich um Tiere, die analysiert wurden, da ihr Gesundheitszustand sich so verschlechtert hatte, dass sie mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit innerhalb der nächsten Tage verendet wären.

Die Phänotypen der Mäuse lassen sich grob in II Gruppen einteilen. Die Gruppe I umfasst jene Mäuse, die eine extreme Splenomegalie entwickelt hatten (Abb. 3.31). Ihr Milzgewicht war im Vergleich zu den Kontrollen um das 20- bis 40-fache erhöht (siehe Tab.1). Außerdem waren die inguinalen Lymphknoten stark vergrößert (Abb. 3.31 C, Tab.1) und es traten zusätzliche Knoten an der Innenseite der Außenhaut auf (Abb. 3.30 C), die wie Lymphknoten einen hohen Anteil an B-Lymphozyten besaßen (nicht gezeigte Daten). Die Analysen der Milz-Lymphozyten im „Forward Scatter“ zeigten, dass der überwiegende Anteil der B-Zellen vergrößert war (Abb.3.31B, Tab. 1).

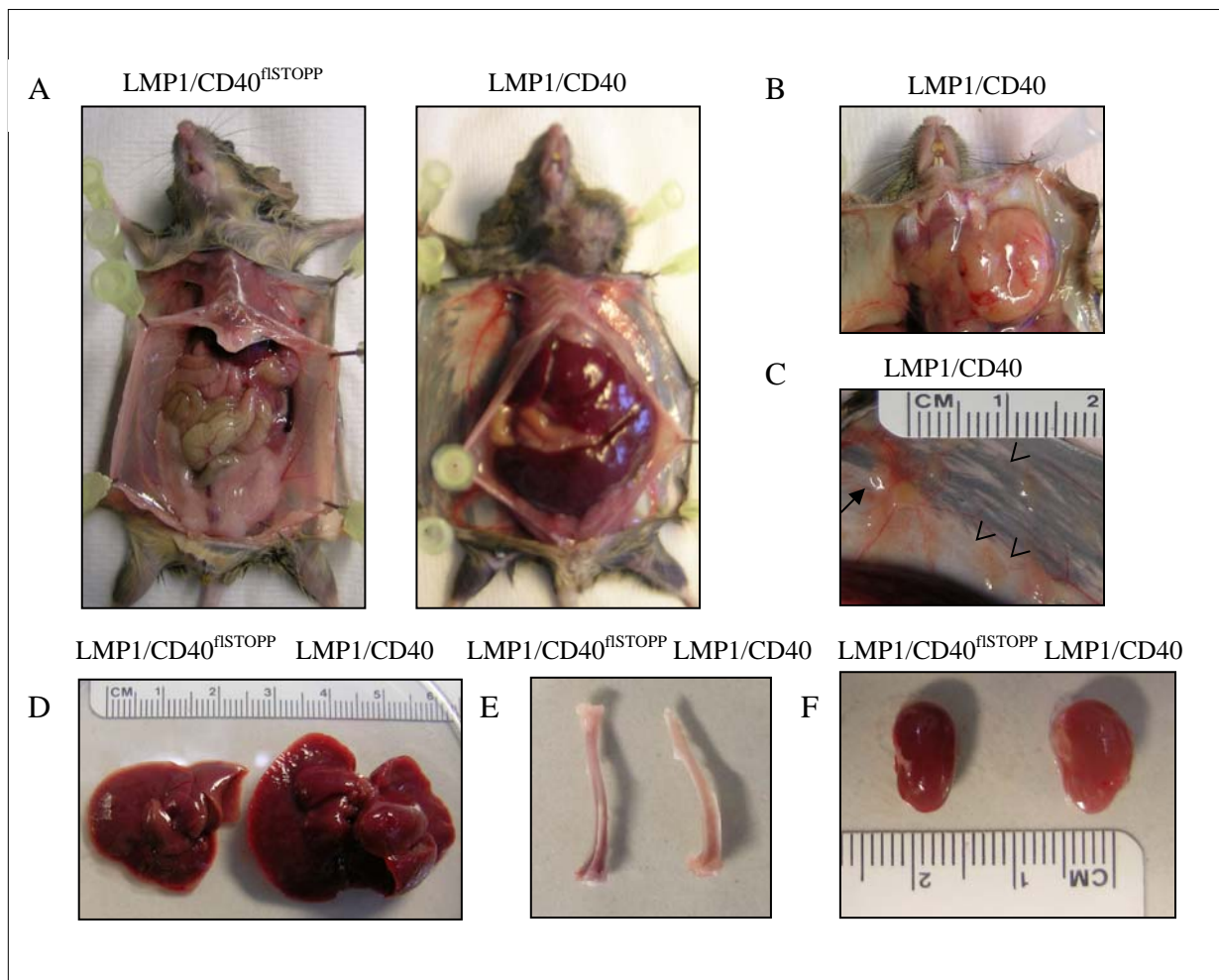
In Mäusen der Gruppe I waren nicht nur die lymphatischen Organe verändert, sondern es trat, wie hier beispielhaft an der Maus #142 gezeigt, in fast allen Fällen begleitend eine Hepatomegalie auf (Abb. 3.30 A, D). Zusätzlich zeigte sich in einigen der erkrankten Mäuse die für eine Anämie typische farbliche Veränderung der Knochen und Nieren, was auf einen Mangel an roten Blutkörperchen zurückzuführen ist und auf eine Störung der Hämatopoese hinweist (Abb. 3.30 E, F). Außerdem entwickelten bis auf eine Ausnahme alle Mäuse der Gruppe I Tumore im Halsbereich.

Gruppe	I							II		Kontrollen
Mäuse #	34	142	176	197	230	364	247	282	201	
Alter in Monaten	17	14	18	14	13	12	15	12	14	12-17
Splenomegalie /g	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	+	-
	4,62	4,28	3,07	/	1,96	/	/	0,55	0,38	0,12 (+/-0,02)
Hepatomegalie	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	-	/	-
Tumor im Halsbereich	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Vergrößerte Lymphknoten	++	++	++	+++	+	+	+	+	+	-
Größe der B-Zellen im FSC/Median	476	386	359	425	326	280	276	375	263	252 (+/-39,9)
Anteil B-Zellen (B220+) in der Milz	48%*	88%	35%	37%	59%	35%	9%	25%	1,3%	59% (+/-9,3)
Anteil T-Zellen (Thy1.2+) in der Milz	29%	6%	28%	26%	19%	28%	46%	3%	58%	34% (+/-7,8)
Marker Expression auf B-Zellen (B220+)										
	CD21	-	-	-	-	-	-	82%+	/	+ 78% (+/-3,8)
	CD23	-	-	-	-	-	-	86%+	/	+ 87% (+/-4,5)

**Tabelle 3.1 Charakterisierung der an lymphoproliferativen Erkrankungen leidenden Mäuse**

In der Tabelle sind die an lymphoproliferativen Erkrankungen leidenden Mäuse aufgeführt. Es handelt sich in allen Fällen um LMP1/CD40-exprimierenden Mäuse (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>x CD19cre) (#230 ist zusätzlich CD40 defizient). Parallel zu diesen wurden Kontrollen gleichen Alters präpariert, diese sind unter der Rubrik „Kontrollen“ zusammengefasst. Die in dieser Rubrik angegebenen Werte errechnen sich aus mindestens fünf Kontrollen, die zwischen 12 und 17 Monate alt waren. Zeichen: (/) Daten liegen für diese Kategorie nicht vor; (-) Phänotyp tritt nicht auf oder war nicht nachweisbar; (+) Phänotyp ist aufgetreten; (++) Phänotyp stark ausgeprägt; (+++) Phänotyp besonders stark ausgeprägt.

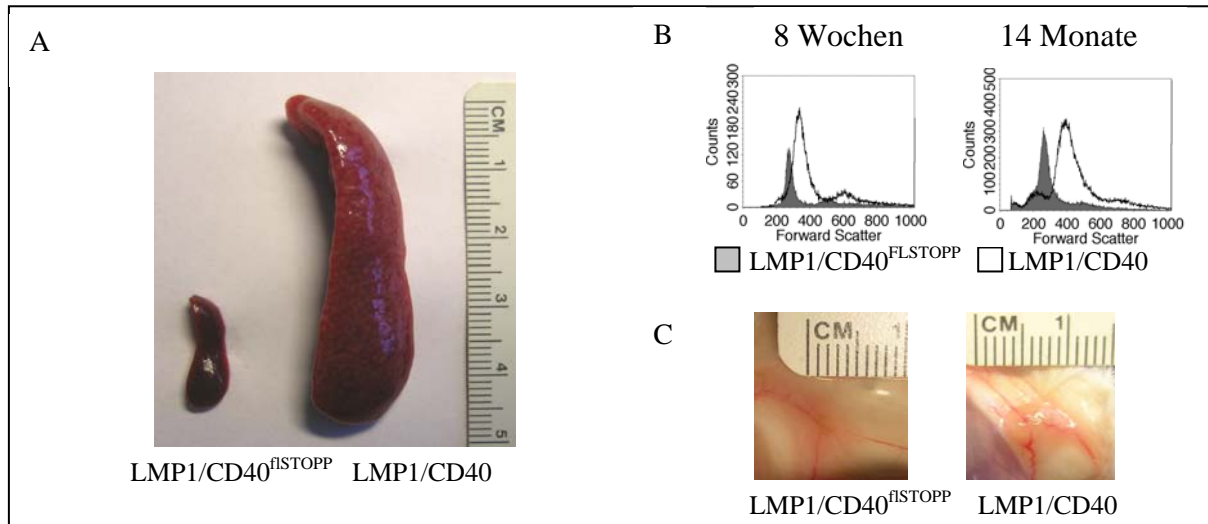
Die Angaben der letzten vier Zeilen wurden durch FACS-Analysen der Milz-Lymphozyten erhoben. B-Zellen wurden durch den Marker B220, T-Zellen durch Thy1.2 charakterisiert. Als Maß für die Größe der B-Zellen (B220+) wurde der Mittelwert aller B-Zellen im „Forward Scatter“ bestimmt (siehe Abb. 3.20). Das bei den Kontrollen angegebene Gewicht errechnet sich aus dem Mittelwert des Gewichtes von 4 verschiedenen 12-17 Monate alten Mäusen. Standardabweichungen sind in Klammern geschrieben. \*Diese Mäuse hatten eine hohe Anzahl CD19-positiver Zellen, die jedoch B220-negativ waren, weshalb der Anteil der B-Zellen anhand der CD19-Färbung durch FACS-Analysen bestimmt wurde.



**Abbildung 3.30 Beispiel einer LMP1/CD40-exprimierenden Maus, die mit 14 Monaten an einer stark ausgeprägten lymphoproliferativen Erkrankung gelitten hat**  
 (A) Rechts ist eine LMP1/CD40-exprimierende Maus (#142) (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre) (LMP1/CD40) zu sehen, die im Alter von 14 Monaten eine stark entwickelte lymphoproliferative Erkrankung aufwies. Links ist eine altersgleiche Kontrollmaus (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>) (#143) zu sehen. (B) Zeigt den Tumor im Halsbereich der Maus (#142). In (C) ist einer der inguinalen Lymphknoten (gefüllter Pfeil) der Maus #142 und die auf der Innenseite der Außenhaut auftretenden Knoten dargestellt. (D) Lebern der Mäuse #142 und #143. (E) Unterschenkelknochen der Mäuse #142 und #143. (F) Abbildung der linken Niere der Mäuse #142 und #143.

Der Gruppe II wurden die Mäuse zugeordnet, deren Splenomegalie nicht stärker ausgeprägt war, als bei jungen, 8-16 Wochen alten LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen, die jedoch wie die Mäuse der Gruppe I einen Tumor im Halsbereich entwickelt hatten und deshalb getötet und analysiert wurden (Abb. 3.30 B).





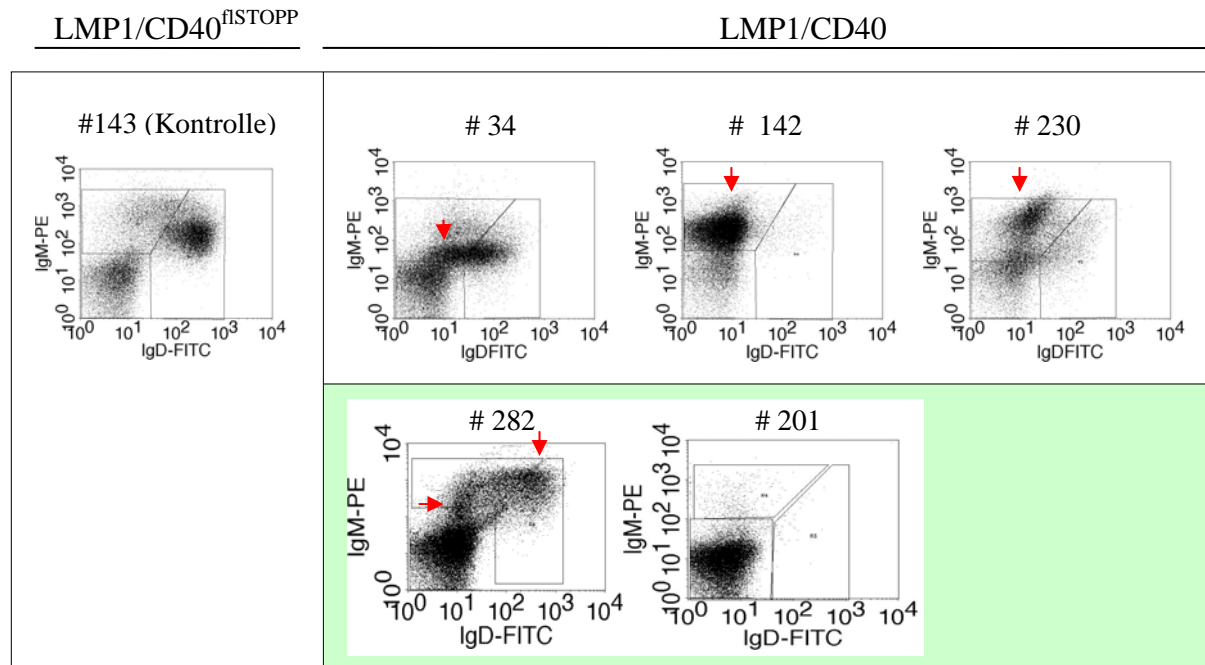
**Abbildung 3.31 In 12-17 Monate alten LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen treten vermehrt lymphoproliferative Erkrankungen auf**

(A) Rechts ist die Milz einer LMP1/CD40-exprimierenden Maus (#197) (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> x CD19cre) zu sehen, die im Alter von 14 Monaten eine stark entwickelte lymphoproliferative Erkrankung aufwies. Links ist die Milz einer altersgleichen Kontrollmaus (#199) LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> gezeigt. (B) FACS-Analysen: B-Zellen (B220+) LMP1/CD40- (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> x CD19cre)-exprimierender Mäuse im Alter von 8 Wochen und einer 14 Monate alten Maus (#142) mit altersgleichen Kontrollen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>). Der Plot zeigt die Verteilung der lebenden (TOPRO-3-) B-Zellen (B220+) im „Forward Scatter“. (C) Rechts ist einer der inguinalen Lymphknoten einer 14 Monate alten (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> x CD19cre)-Maus (#197) und links einer altersgleichen Kontrolle gezeigt (#229).

### 3.3.2 In den Milzen der erkrankten Mäuse dominiert meist eine B-Zellpopulation

Um zu untersuchen, ob in den Mäusen, die eine starke lymphoproliferative Erkrankung entwickelt hatten, die Expansion einer bestimmten Zellpopulation nachzuweisen ist, wurden aus verschiedenen lymphoiden Organen Einzelzellsuspensionen präpariert. Diese wurden mit unterschiedlichen gegen Lymphozytenmarker gerichteten Antikörperkombinationen gefärbt und im FACS analysiert. Bei jeder Analyse wurde eine gesunde Kontrollmaus gleichen Alters mitgeführt. In Mäusen der Gruppe I war meist eine spezifische B-Zellpopulation expandiert, die sich in ihrem Phänotyp von den IgM/IgD-positiven follikulären B-Zellen, die in gesunden Mäusen die Haupt-B-Zellpopulation in der Milz ausmachen, unterschied. Die expandierte Population ist in den hier gezeigten Beispielen mit einem roten Pfeil gekennzeichnet (Abb.3.32). Die Lymphozytenpräparationen der Mäuse der Gruppe II waren phänotypisch heterogener. Bei der Maus #282 grenzte sich keine B-Zellpopulation so stark von den andern Zellen ab wie bei den anderen Beispielen. Es schienen sich jedoch zwei kleine B-

Zellpopulationen mit spezifischem Expressionsmuster entwickelt zu haben. In der Maus # 201 waren fast alle Zellen IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> und CD3<sup>+</sup>, was darauf hinweist, dass die bei dieser Maus beobachtete lymphoproliferative Erkrankung zum überwiegenden Teil von T-Zellen dominiert waren und sich deshalb phänotypisch sehr von den übrigen unterschieden.



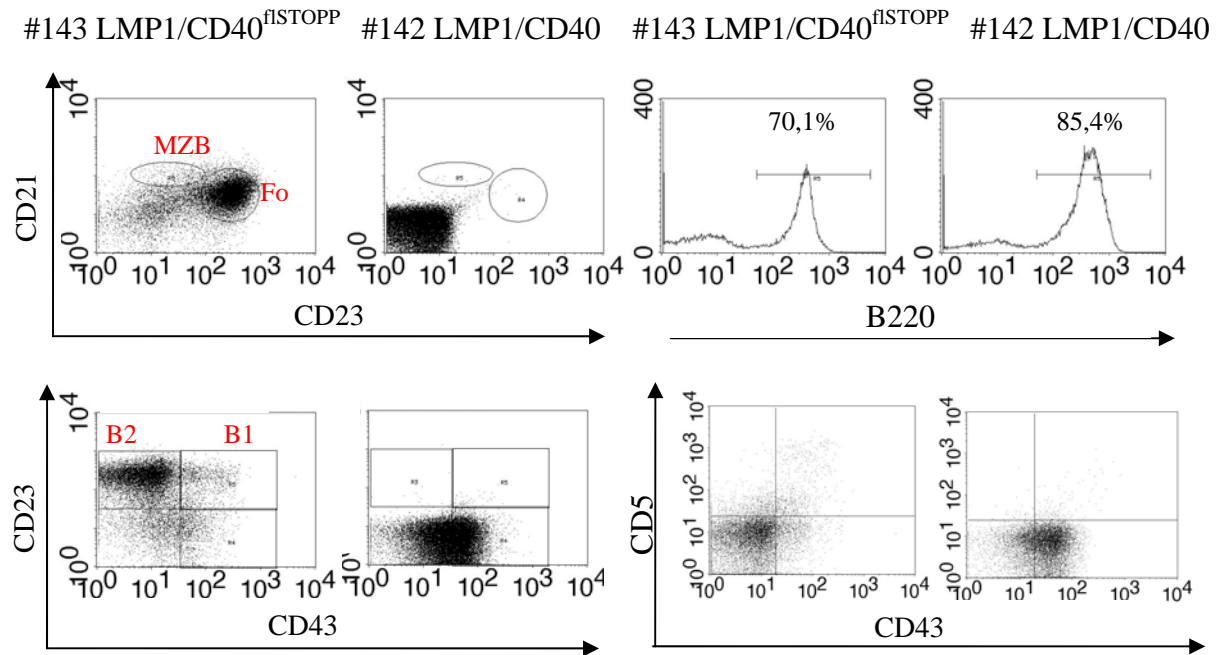
**Abbildung 3.32 FACS-Analysen der Milz-B-Zellen der erkrankten Mäuse**

FACS-Analysen der Milzzellen erkrankter LMP1/CD40-exprimierender Mäuse (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre) F1 (LMP1/CD40) und einer Kontrolle LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> nach der Färbung mit  $\alpha$ -IgM und  $\alpha$ -IgD-Antikörpern. Weiß unterlegt finden sich Beispiele für erkrankte Mäuse der Gruppe I (oben), und grün unterlegt, erkrankte Mäuse der Gruppe II (unten). Ungewöhnliche B-Zellpopulationen, die in Wildtyp-Mäusen nicht in dieser Form auftreten, sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Die Milz-B-Zellen der LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen der Gruppe I waren nicht nur in ihrem IgM- und IgD-Expressionsmuster verändert sondern waren im Gegensatz zu B2-Zellen der Kontrollen CD21 und CD23 negativ. Dies ist in Abbildung 3.33 am Beispiel der Maus #142 gezeigt. CD21 und CD23 werden normalerweise von allen follikulären B-Zellen exprimiert und wurden auch auf den B2-Zellen von LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen, die keine Tumore entwickelt hatten, nachgewiesen (Abb. 3.12). In einigen Mäusen der Gruppe I waren die B220<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> B-Zellen zusätzlich CD43<sup>+</sup>, ein Protein das normalerweise von frühen B-Zellen im Knochenmark oder von B1-B-Zellen exprimiert wird. Es zeigte sich jedoch, dass diese CD43-positive Zellen kein CD5 exprimierten, einem weiteren B1-Zellmarker, (Abb.3.33 unten). Diese Zellen, die durch B220 oder CD19 Expression als B-Zellen identifiziert wurden, zeigten somit einen Phänotyp der sich normalerweise weder bei B1- noch bei B2-Zellen von Wildtyp-Mäusen findet. Eine solche Veränderung wird oft bei

Lymphomzellen beobachtet, es kann daher vermutet werden, dass diese Mäuse an Lymphomen erkrankt waren.

Auf den Milz-B-Zellen von Mäuse der Gruppe II konnte sowohl CD21- als auch CD23-Expression nachgewiesen werden, wobei zu beachten ist, dass die Maus #201 insgesamt nur sehr wenige B-Zellen besaß (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.33 Milz-B-Zellen der erkrankten LMP1/CD40-Mäuse zeigen eine starke Veränderung der Oberflächenmarker**

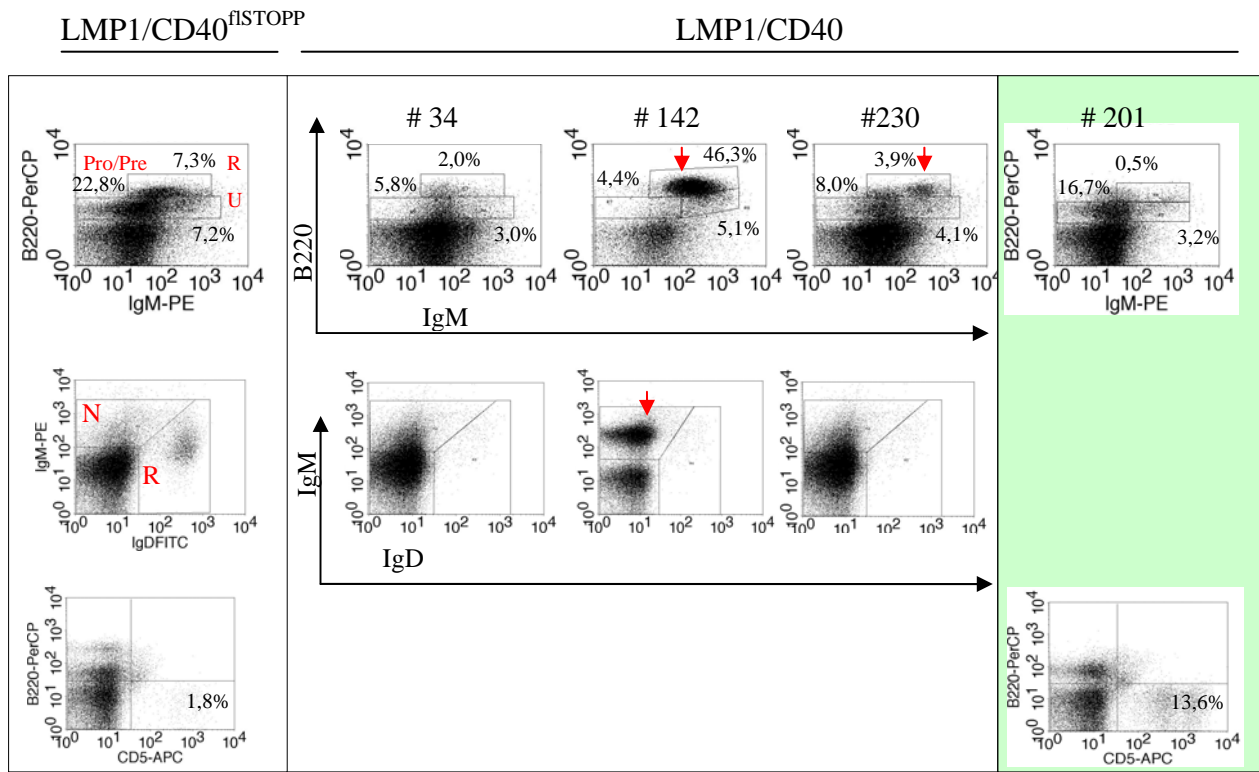
Die Abbildung zeigt Beispiele für FACS-Analysen, die mit Milzzellen der erkrankten LMP1/CD40-exprimierenden Maus #143 (LMP1/CD40) und einer entsprechenden Kontrolle (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>) durchgeführt wurden. Die CD21/CD23-Färbung ermöglicht es Marginalzonen-B-Zellen (MZB) (CD23<sup>niedrig</sup>CD21<sup>hoch</sup>) und folliculäre B-Zellen (Fo) (CD23<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>) zu unterscheiden. Die Histogramme oben zeigen den Anteil (Prozentangabe) der B220+ Zellen der Milzzellen. In den unteren Abbildungen wurden nur B220-positive Zellen aufgetragen. Durch die Färbung von CD23 und CD43 können im Wildtyp die B2-B-Zellen (CD23<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>) von den B1-B-Zellen (CD23<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>) getrennt werden. In der Färbung CD5, CD43 können die B1-B-Zellen (CD5<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>) detektiert werden.

### 3.3.3 Die frühe B-Zellentwicklung ist in Mäusen mit lymphoproliferativen Erkrankungen stark beeinflusst

Ein typisches Merkmal von Lymphomen ist, dass im fortgeschrittenen Stadium Tumor-Zellen oft nicht nur das primär befallene Organ besiedeln, sondern auch in andere Organe einwandern wie z.B. in das Knochenmark. Im Knochenmark werden dann oft die Lymphozyten-Vorläufer von den einwandernden Zellen verdrängt, wodurch es zu einer Störung der frühen Hämatopoese kommt. Um zu überprüfen, ob auch die B-Zell Populationen



des Knochenmarks der erkrankten LMP1/CD40 exprimierenden Mäuse Veränderungen zeigen, wurde dieses präpariert, mit verschiedenen Antikörperkombinationen gefärbt und im FACS analysiert.



**Abbildung 3.34 Im Knochenmark von LMP1/CD40-exprimierenden Mäuse mit lymphoproliferativer Erkrankung lassen sich wieder reife B-Zellen nachweisen**

FACS-Analysen der Knochenmarks-Zellen erkrankter (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäuse (LMP1/CD40) und einer Kontrollmaus (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>), nach der Färbung mit  $\alpha$ -IgM-  $\alpha$ -IgD- und  $\alpha$ -B220-Antikörpern. In der ersten Reihe sind die Anteile der Pro/Pre-B-Zellen (B220<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>), der unreifen B-Zellen (U) (B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>) und der rezirkulierenden Zellen (R) (B220<sup>hoch</sup>IgM<sup>+</sup>) in Prozent angegeben. Beispiele für erkrankte Mäuse der Gruppe I sind weiß und die der Gruppe II grün unterlegt. Ungewöhnliche Populationen sind mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Da sich in der Maus # 201 hauptsächlich T-Zellen in der Milz befanden, wurde für diese Maus der Anteil der T-Zellen (B220<sup>-</sup>CD5<sup>+</sup>) im Knochenmark mittels FACS analysiert.

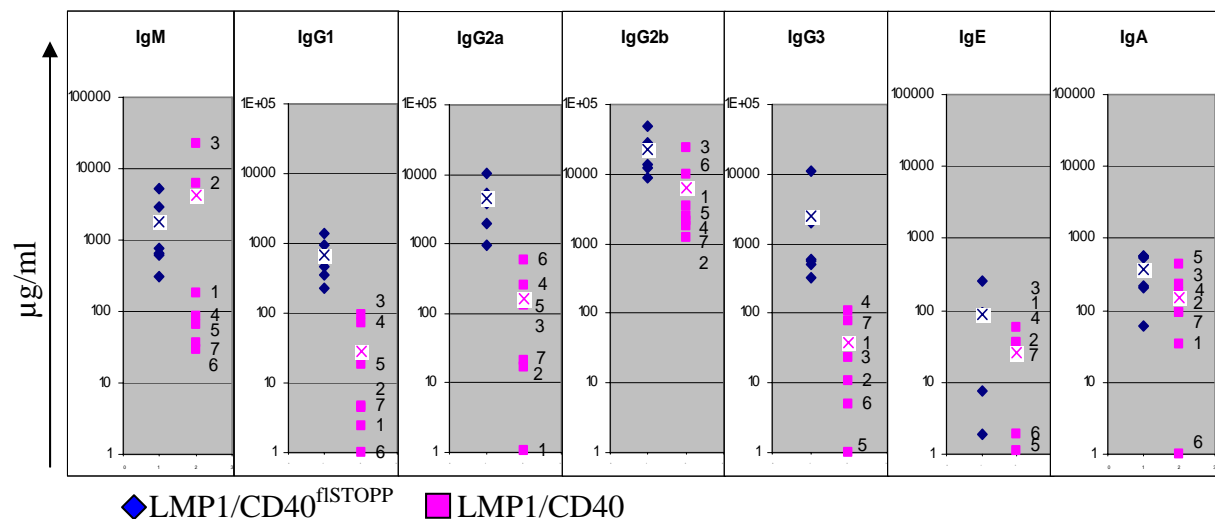
Der Anteil der Pro/Pre-B-Zellen (B220<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>) sowie der unreifen B-Zellen (B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>) war in allen untersuchten Mäusen stark reduziert (Abb. 3.34). In der Maus #142 wurden außerdem B-Zellen im Knochenmark gefunden, die wie die B-Zellen welche in der Milz stark expandiert (Abb. 3.32) waren, sehr viel IgM und B220 jedoch kein IgD auf der Oberfläche exprimierten. In der Maus #230 konnte ebenfalls eine kleine Population (IgM<sup>hoch</sup>B220<sup>hoch</sup>) identifiziert werden, die sich in der IgM/IgD-Färbung jedoch nicht auftrennen ließ. Diese Zellen zeigten den Phänotyp rezirkulierender B-Zellen, die in den jungen LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen normalerweise stark reduziert sind (Abb. 3.8).

Da in der Maus #201 der Gruppe II hauptsächlich T-Zellen in der Milz nachgewiesen wurden, wurden die Zellen des Knochenmarks auf die Expression von CD5 und B220 untersucht. Im Knochenmark dieser Maus konnte im Vergleich zu der Kontrolle eine ungewöhnliche B220<sup>-</sup> CD5<sup>+</sup> T-Zellpopulation nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die frühe B-Zellentwicklung in allen erkrankten Mäusen stark verändert war und in einigen Fällen Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden konnten, die phänotypisch den in den Milzen expandierten Zellpopulationen sehr ähnlich waren.

### 3.3.4 *LMP1/CD40-exprimierende Mäuse mit lymphoproliferativen Erkrankungen, haben weniger Immunglobuline im Blutserum*

Da die B-Zellen der erkrankten Mäuse einen stark veränderten Phänotyp haben, stellte sich die Frage, ob diese noch funktionell aktiv sind. Ein Hinweis auf die Funktion der B-Zellen können die in das Blut sezernierten Immunglobuline liefern. Es konnte gezeigt werden, dass die Immunglobulin-Konzentrationen im Serum im Vergleich zu den Kontrollen stark reduziert waren. Lediglich zwei der erkrankten Mäuse, #142 und #137, zeigten erhöhte IgM-Titer (Abb. 3.35). Dieses Ergebnis spiegelt wie erwartet eine starke Einschränkung des Immunsystems dieser Tiere wider.

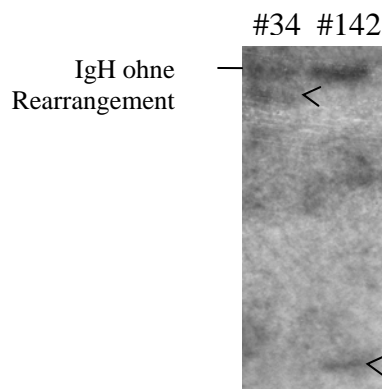


**Abbildung 3.35 Quantifizierung der Immunglobuline im Serum erkrankter Mäuse über ELISA**

Die Abbildung zeigt die Mengen der Immunglobulinkonzentrationen verschiedener Isotypen in (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> x CD19<sup>cre</sup>)-Mäuse (LMP1/CD40) (#230 außerdem CD40<sup>-/-</sup>) und Kontrollmäuse (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>) im Alter von 12-17 Monaten. Je Gruppe wurden die Seren von mindestens fünf verschiedenen Mäusen analysiert. Die Nummern kennzeichnen die unterschiedlichen Seren der Tumormäuse: #34 (1), #142 (2), #137 (3), #197(4), #230 (5), #282 (6), #201 (7).

### 3.3.5 Die in den erkrankten Mäusen expandierte B-Zellpopulation ist monoklonal

Bei Lymphomerkrankungen kommt es in der Regel zu der Expansion eines oder einiger weniger B-Zellklone. Daher wurden die Zellen der Milz durch Southern-Blot-Analysen auf Monoklonalität der B-Zellen untersucht. Der Blot wurde mit einer *IgH*-Sonde hybridisiert, die spezifisch an einen Teil des *IgH*-Lokus bindet. Durch die verschiedenen Umlagerungen im Immunglobulin-Lokus während der Generierung des B-Zell-Rezeptors, detektiert die Sonde in normalen B-Zellen Fragmente unterschiedlichster Längen. Im Southern-Blot kann daher bei normalen B-Zellen keine distinkte Bande, sondern nur ein DNA-Schmier detektiert werden. Nur wenn es zu einer Expansion eines einzelnen B-Zell-Klons kommt, kommen genügend Fragmente einer Länge vor, um sie als Bande auf der Membran detektieren zu können. In zwei der sieben erkrankten Mäuse der Gruppe I konnte ein spezifisches Fragment nachgewiesen werden. (Abb. 3.36). Aufgrund der relativ geringen Sensitivität kann mit diesem Versuch nicht ausgeschlossen werden, dass es in den anderen Mäusen dieser Gruppe ebenfalls zu einer Expansion einiger weniger Klone gekommen ist. Dieses Ergebnis zeigt jedoch, dass zumindest zwei der Mäuse mit hoher Wahrscheinlichkeit Lymphome entwickelt haben die von einem Klon dominiert werden.

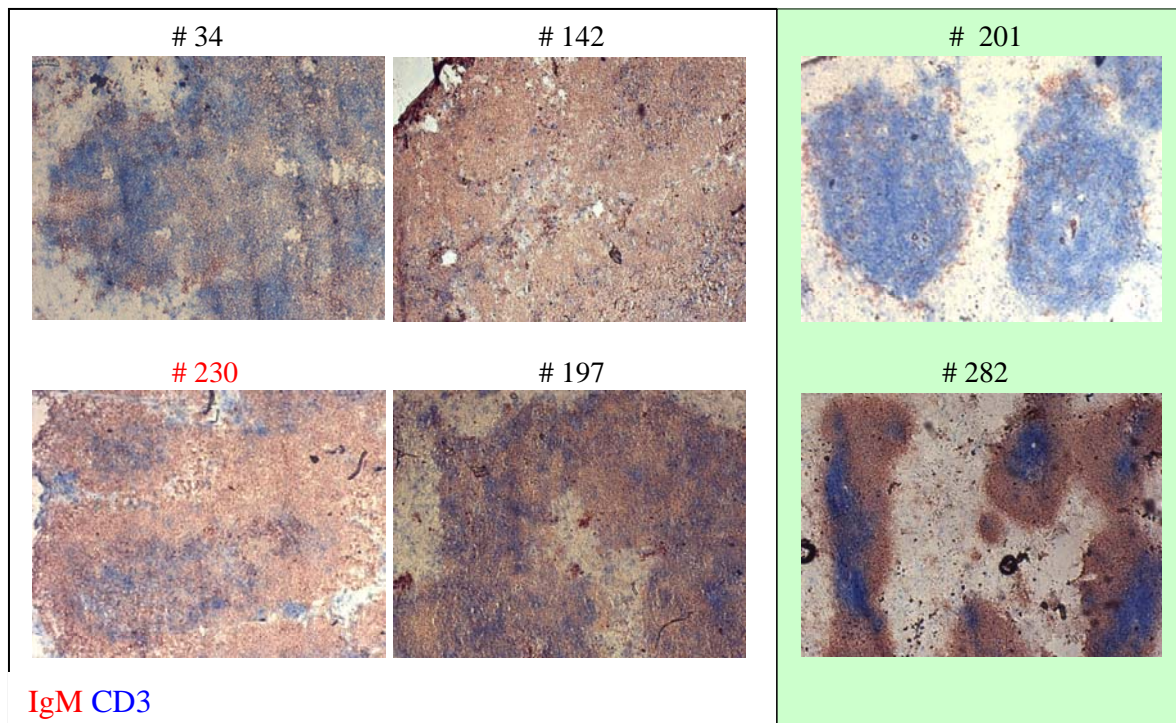


#### Abbildung 3.36 Nachweis monoklonaler B-Zellpopulationen mittels Southern-Blot

Southern-Blot mit *EcoRI* geschnittener DNA aus Milz Zellen der LMP1/CD40-exprimierenden Mäuse #34 und #142. Der *IgH*-Lokus wurde mit einer spezifischen *IgH*-Sonde nachgewiesen (Gao et al., 2000). Die obere Bande zeigt den *IgH*-Lokus der Zellen, in denen keine Umlagerung des Lokus stattgefunden hat. Sie stammt von DNA der nicht-B-Zellen der Milz oder vom anderen Allel der Zellen. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Banden zeigen das *IgH*-Fragment spezifischer in diesen Mäusen expandierten B-Zell Klone.

### 3.3.6 Die follikuläre Struktur der Milz ist in erkrankten Mäusen stark verändert und zum größten Teil völlig aufgelöst

Wie die FACS-Analysen bereits zeigten, ist der Anteil der B- und T-Zellen in der Milz der erkrankten Mäuse verändert und von einzelnen Zellpopulationen stark dominiert. Es stellte sich daher die Frage, ob diese Zellen noch in der Lage sind, sich normal in den zellulären Kontext einzugliedern, oder ob es zu einer Verdrängung der follikulären Zellen durch die neoplastischen Zellen kommt.



**Abbildung 3.37 In den Milzen der erkrankten Mäuse ist die Struktur der Follikel zerstört**

Gefrierschnitte der Milz aus LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen (LMP1/CD40<sup>flSTOPP<sub>x</sub></sup> CD19cre) (LMP1/CD40), die eine lymphoproliferative Erkrankung entwickelten. In den Schnitten wurden die B-Zellen mit  $\alpha$ -IgM-Antikörpern (rot) und die T-Zellen mit  $\alpha$ -CD3-Antikörpern (blau) angefärbt. Gefrierschnitte der Milz von Mäusen der Gruppe I sind weiß unterlegt, die der Gruppe II sind grün unterlegt.

Um einen Überblick über die Verteilung der Zellen im Gewebe zu bekommen, wurden Gefrierschnitte angefertigt, und die B-Zellen mit  $\alpha$ -IgM-Antikörpern bzw. die T-Zellen mit  $\alpha$ -CD3-Antikörpern angefärbt. Wie in Abbildung 3.37 zu sehen ist, war bei allen Tieren der Gruppe I die Follikel-Struktur stark gestört beziehungsweise eine normale Gliederung der Zellzonen nicht mehr vorhanden. Mit Ausnahme der Maus #282, die der Gruppe II zugeordnet wurde, war es nicht mehr möglich, die B- und T-Zell-Zone innerhalb der weißen Pulpa, der lymphozytenreichen Region, zu unterscheiden. Dieses Ergebniss ist ein weiterer

Hinweis darauf, dass alle Mäuse der Gruppe I, auch in den Fällen in denen bisher keine Monoklonalität nachweisbar war, B-Zell-Lymphome entwickelt haben.

### ***3.3.7 LMP1/CD40-exprimierende Mäuse entwickeln follikuläre Lymphome***

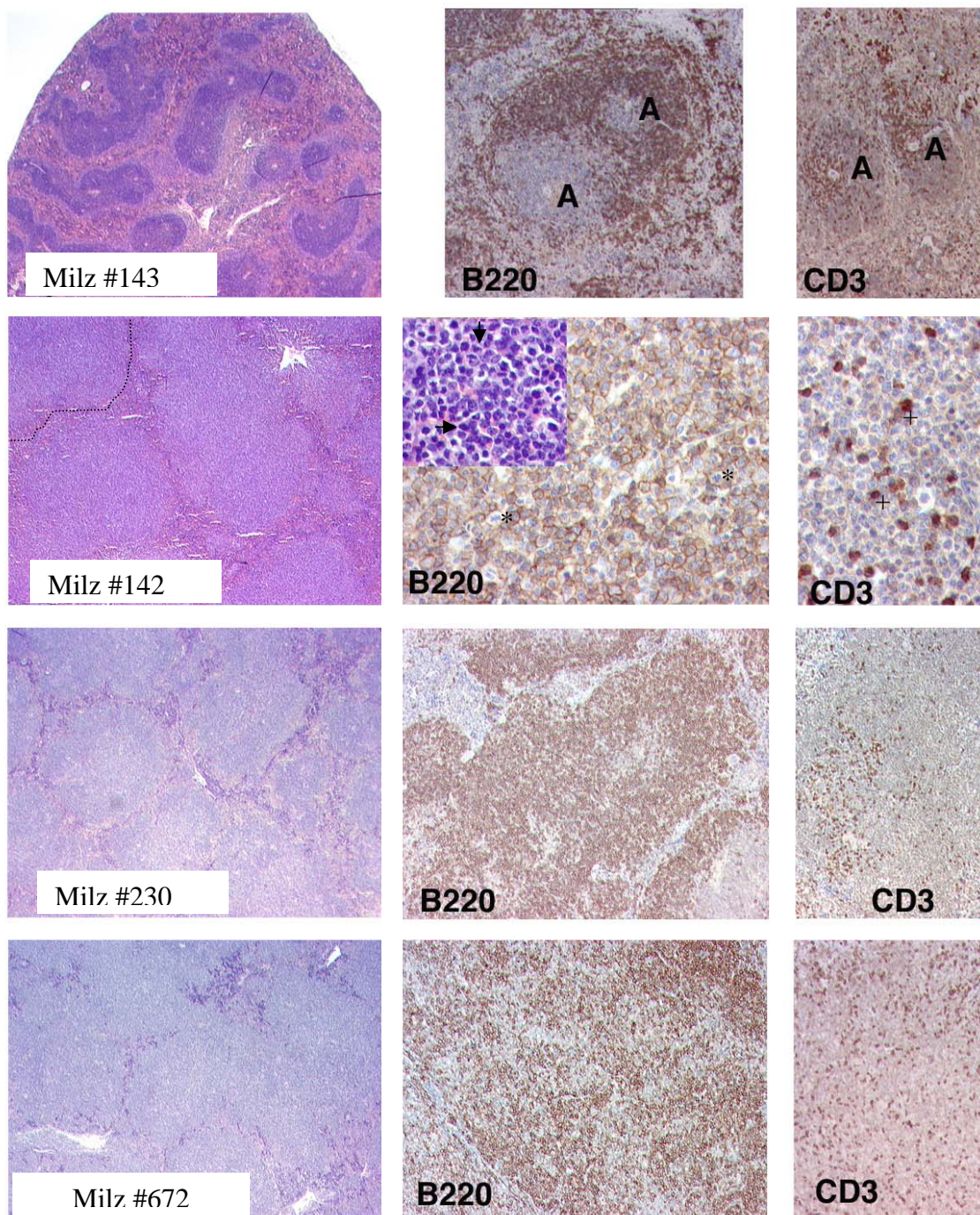
Um die Tumore der hier untersuchten Mäuse näher klassifizieren zu können, wurde ergänzend zu der Phänotypisierung der einzelnen Zellen eine histologische Tumordiagnostik durchgeführt. Dazu wurde die Hilfe der Pathologin Frau Dr. Quintanilla-Fend (GSF) in Anspruch genommen. Bei der Tumordiagnostik werden eine Reihe verschiedener Techniken, wie unter anderm histologische Analysen und immunohistochemische Färbungen angewandt. Die Tumore können oft bereits durch die Lokalisation und Morphologie der Zellen, sowie des Gewebes, klassifiziert werden. Durch die Kombination mit molekularbiologischen Analysen lassen sich Tumore genauer charakterisieren und eindeutiger zuweisen. Die hier gezeigten Schnitte und die Befundung wurden von Frau Dr. Quintanilla-Fend durchgeführt. Es wurden Paraffin-Schnitte verschiedener Organe der Mäuse #34, #142, #143, #201, #230, #672 und #673 angefertigt und mit Hämatoxilin-Eosin (HE) gefärbt. Zusätzlich wurden in einigen der hier gezeigten Schnitten die B-Zellen mit  $\alpha$ -B220-Antikörper (B220) oder die T-Zellen mit  $\alpha$ -CD3-Antikörper (CD3) detektiert.

In der Milz von Wildtyp-Mäusen (Beispiel: Abb. 3.38, Maus #143) sind die Follikel der Milz durch die Färbung mit Hämatoxilin-Eosin (HE), bereits gut zu erkennen. Die lymphozytenreiche weiße-Pulpa der Follikel hebt sich dunkel von der roten-Pulpa ab. Auch deutlich zu erkennen ist der Marginale-Sinus mit den außerhalb des Sinus liegenden MZB-Zellen, die sich als heller Rand vom Follikel abheben. Die mit Hämatoxilin und  $\alpha$ -B220-Antikörper oder  $\alpha$ -CD3-Antikörper gefärbten Schnitte zeigen einzelne Follikel in einer stärkeren Vergrößerung. In diesen sind die B-Zell-Zonen und die um die zentralen Arteriolen (Abb.3.38 (A)) angeordneten T-Zell-Zonen gut zu erkennen.

In den HE-Färbungen aller untersuchten Milzen von erkrankten Mäusen zeigten sich noduläre Infiltrate von kleinen und großen lymphoiden Zellen (Beispiel in Abb. 3.38). Noduläre Infiltrate kennzeichnen sich durch die knotenförmige Aggregation von neoplastischen lymphoiden Zellen, die die normalen lymphatischen Zellen verdrängen. Bei den infiltrierenden Zellen handelt es sich, wie in den Färbungen mit  $\alpha$ -B220 Antikörpern und  $\alpha$ -CD3-Antikörpern sichtbar wird, hauptsächlich um B-Zellen, die mit einer Anzahl von T-Zellen durchmischt sind. Beispiele sind in der Abbildung 3.38 (#142, #230, #672) gezeigt. In den Mäusen #34 und #673 wurden die B-Zellen mit einer immunohistochemischen Färbung



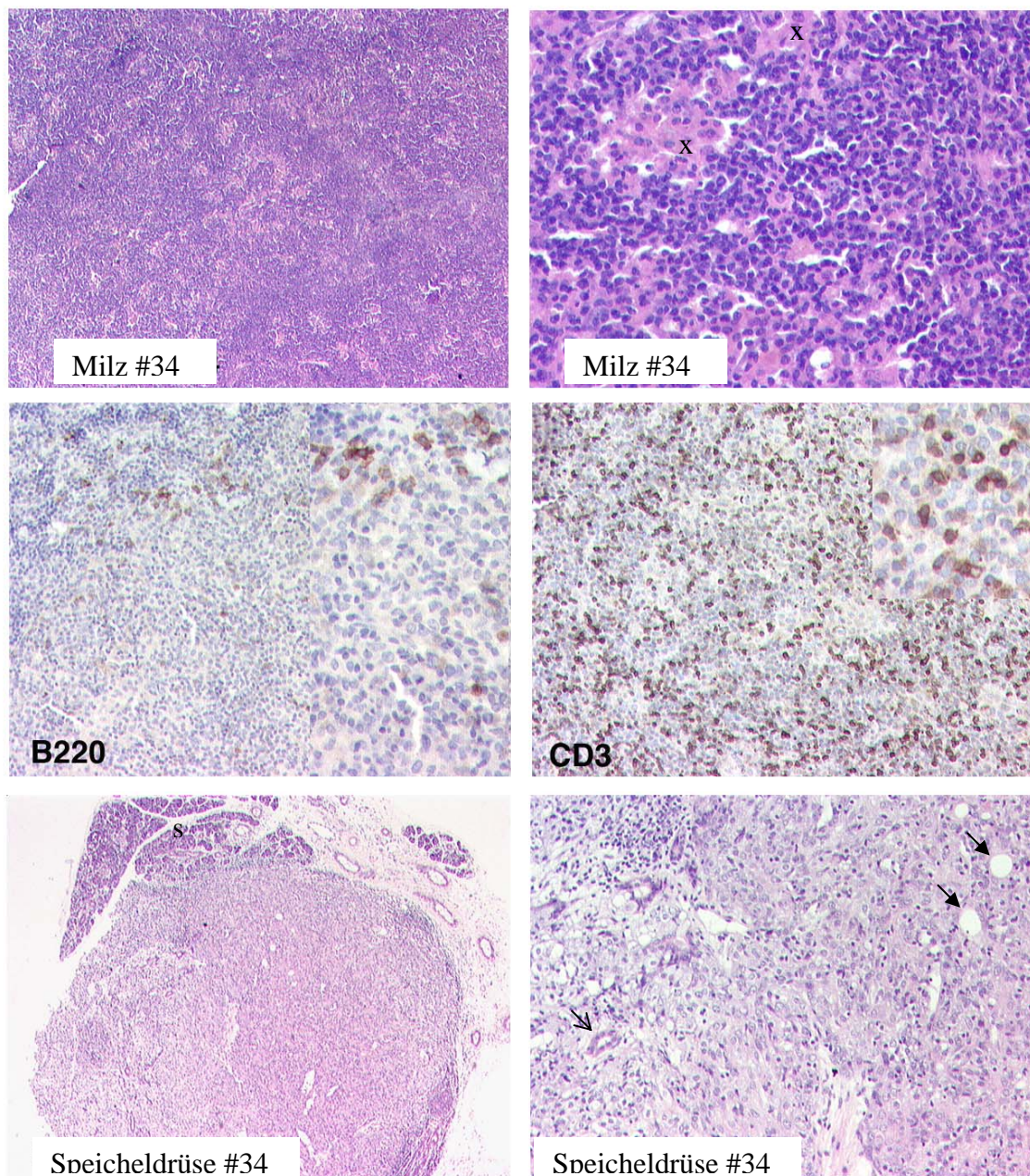
von CD79b und Pax5 nachgewiesen (nicht gezeigte Daten), da sie kein B220 auf der Oberfläche exprimierten (Beispiel: siehe Abb. 3.39).



**Abbildung 3.38 Paraffin-Schnitte zur histologischen Analyse der erkrankten LMP1/CD40-Exprimierenden Mäuse**

Hämatoxylin-Eosin gefärbte Paraffin-Schnitte der Milzen einer Wildtyp Maus (oberste Reihe) und von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre) Mäusen mit malignen Erkrankungen (Reihen zwei bis vier). In den mit B220 gekennzeichneten Hämatoxylin gefärbten Schnitten wurden die B-Zellen zusätzlich mit einem  $\alpha$ -B220-Antikörper angefärbt (braun). In denen mit CD3 gekennzeichneten Schnitten wurden die T-Zellen mit einem  $\alpha$ -CD3-Antikörper angefärbt. Zeichen: (\*) Zellen in Mitose; (+) reaktive T-Lymphozyten; (gestrichelte Linie) Beispiel für ein nodulares Infiltrat; (A) Arteriole, Pfeile polymorphe B-Zellen.





**Abbildung 3.39 Paraffin-Schnitte zur histologischen Analyse einer erkrankten LMP1/CD40-exprimierenden Maus**

Hämatoxylin-Eosin gefärbte Paraffin-Schnitte der Milz sowie des in der Speicheldrüse entstandenen Tumors der Maus #34. In dem mit B220 gekennzeichneten Hämatoxylin gefärbten Schnitt wurden die B-Zellen mit einem  $\alpha$ -B220-Antikörper angefärbt (braun). In dem CD3 gekennzeichneten Schnitt wurden die T-Zellen mit einem  $\alpha$ -CD3-Antikörper angefärbt. Zeichen: (X) epitheloide Histozyten; (S) Speicheldrüsen Gewebe; (gefüllter Pfeil) degenerierte Zysten; (offener Pfeil) normale Zyste der Speicheldrüse

Dass es sich bei den infiltrierten Zellen um Tumorzellen handelt, zeigt sich zum einen daran, dass die Zellen sich nicht in die follikulären Strukturen eingliedern, sondern diese verdrängt hatten. Zum anderen sind die Kerne morphologisch verändert und zeigen nicht mehr die für B-Zellen typische runde Form, sondern sind polymorph (Beispiel: 37, Reihe 2 Vergrößerung der HE-Färbung (Pfeile)). Auffällig war außerdem, dass die B-Zellen in der Milz von drei Mäusen mitotisch hoch aktiv waren (siehe Abb. 3. 38 (\*)). Neben den B-Zellen waren die Milzgewebe wie in den mit CD3- gefärbten Schnitten zu sehen ist, mit einer Anzahl kleiner T-Zellen durchsetzt. Da sie im ganzen Gewebe verteilt sind, handelt es sich bei diesen wahrscheinlich um reaktive T-Zellen, die oft in Lymphomen auftreten.

Besonders anzumerken ist, dass in den zwei Mäusen (#34, #673), die den B-Zell-Marker B220 nicht auf der Oberfläche exprimierten, die noduläre Struktur nur noch schwach erkennbar war und die Milzen von einer Reihe epithelioider Histozyten durchsetzt waren (Beispiel: siehe Abb. 3.39 Reihe 1 (x)).

Die Untersuchung weiterer Organe der beiden Mäuse # 672 und #673 ergab, dass auch in den Lymphknoten, den Nieren, der Leber und der Lunge noduläre Infiltrate von kleinen und großen lymphatischen Zellen zu sehen waren. Zusätzlich wurden in der Lunge Adenome und Adenokarzinome gefunden (nicht gezeigte Daten).

Da es sich bei den neoplastischen Zellen um kleine oder große polymorphkernige B-Zellen handelt, die in nodulärer Form hauptsächlich die Milz, aber auch andere Organe infiltrieren, konnten die Neoplasien aller sechs Mäuse nach den Richtlinien des „Bethesda Proposal“ für die murinen hämatologischen Neoplasien als follikuläre Lymphome klassifiziert werden.

Fast alle Mäuse der Gruppe I und der Gruppe II hatten Tumore im Halsbereich entwickelt. Auf Grund des den Tumor umgebenden Gewebes (Beispiel: Abb. 3.39 (S)) zeigte sich, dass sich die Tumore aus Gewebe der Speicheldrüse entwickelt hatten. Diese Tumore gingen außerdem mit einer zystischen Degeneration (Abb. 3.39 Pfeile) einher. Aufgrund der Lage am Hals, sowie mit Hilfe von histologischen Schnitten, konnten diese Tumore als gering differenzierte Karzinome der Speicheldrüse identifiziert werden.

### **3.4 Einfluss von EBNA2 auf B-Zellen *in vivo***

#### ***3.4.1 Generierung einer EBNA2-exprimierenden Mauslinie***

EBNA2 („EBV nuclear antigen 2“) ist als einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren des Epstein-Barr-Virus für die Immortalisierung von primären B-Zellen essenziell. Es ist eines der ersten viralen Gene, die von den Zellen nach Infektion mit dem Virus exprimiert werden



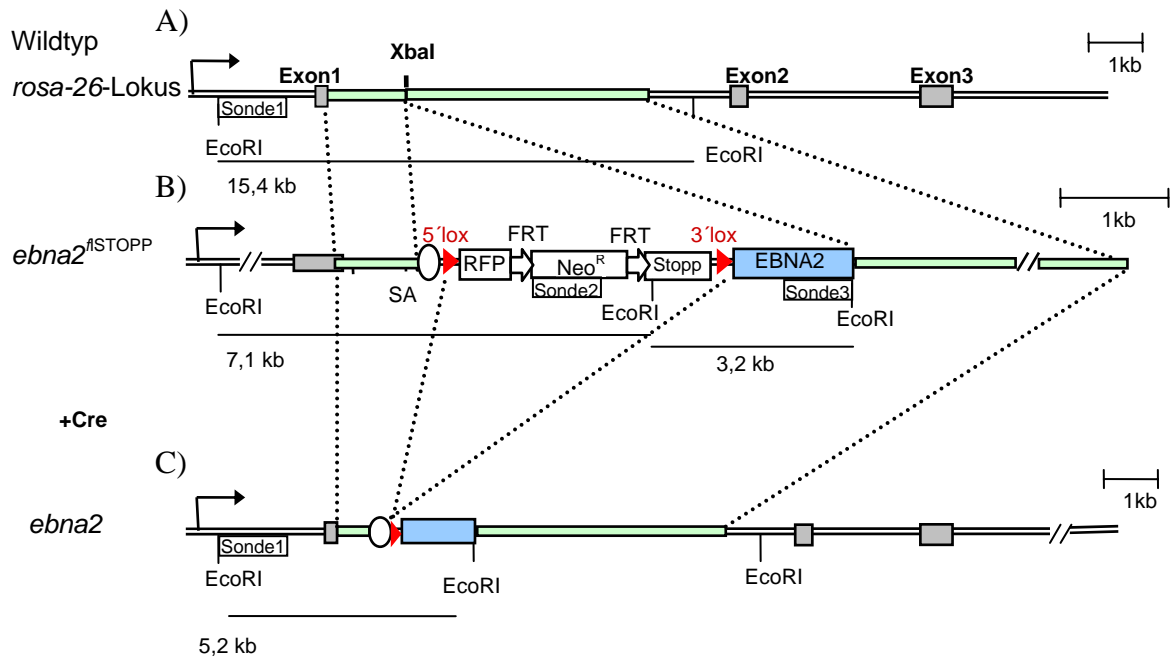
und steuert die Expression anderer viraler Gene, wie z.B. LMP1 und LMP2A. EBNA2 aktiviert seine Zielgene genau wie die Proteine der Notch-Familie über RBP-J. Aus diesem Grund wird angenommen, dass EBNA2 einen konstitutiv aktiven Notch-Rezeptor imitiert. Während die Aktivität von Notch jedoch unter anderem durch Ligandenbindung reguliert wird, wirkt EBNA2 Liganden-unabhängig (zur Übersicht Zimmer-Strobl and Strobl, 2001; Kempkes et.al. 2005). Wie anhand von Virus Mutanten entdeckt wurde, ist EBNA2 für die von EBV vermittelte Immortalisierung von B-Zellen essentiell (Hinuma et al., 1967; Miller et al., 1974).

Ob EBNA2 *in vivo* selber Einfluss auf B-Zellen hat, ist bislang nicht bekannt. Anhand der *in vitro* Studien über EBNA2 lässt sich dies nur schwer klären, da das Protein immer in bereits transformierten Zellen, wie Tumorzelllinien, oder in Verbindung mit anderen Proteinen des Epstein-Barr-Virus exprimiert wurde. Es stellt sich daher die Frage, ob bei der Immortalisierung von B-Zellen *in vivo* durch EBV EBNA2 nur die transkriptionelle Regulation der EBV-Gene übernimmt oder auch durch die direkte Aktivierung zellulärer Gene Einfluss auf diesen Prozess nimmt. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein transgener Mausstamm generiert, der eine B-Zell-spezifische Expression von EBNA2 ermöglicht.

### **3.4.2 Generierung der transgenen Mauslinie EBNA2<sup>flSTOPP</sup>**

Das *ebna2* Gen wurde wie bei der zuvor beschriebenen LMP1/CD40-Mauslinie, in die *XbaI*-Schnittstelle im ersten Intron des *rosa26*-Lokus integriert, wo es vom Rosa 26-Promotor gesteuert werden kann (Abb. 3.40). Die Integration erfolgte mit Hilfe eines Targeting-Vektors (Appendix 2), der zwei zum *rosa26*-Lokus homologe Bereiche besaß. Diese erstrecken sich 5' über einen 1kb langen Bereich, der das erste Exon des *rosa26*-Lokus bis zur *XbaI*-Schnittstelle im ersten Intron beinhaltet und 3' einen 4kb langen Bereich, der die Sequenz von der *XbaI*-Schnittstelle im ersten Introns bis kurz vor das zweite Exon enthält (Abb. 3.41). Um die Expression von EBNA2 zellspezifisch steuern zu können, wurde vor dem Transgen eine von loxP-Stellen flankierte Stopp-Kassette integriert, welche die Expression des Proteins zunächst verhindert. Durch spezifische Expression der Rekombinase Cre kann die Stopp-Kassette jedoch zelltypspezifisch deletiert werden, infolge dessen EBNA2 exprimiert wird (Abb. 3.40).

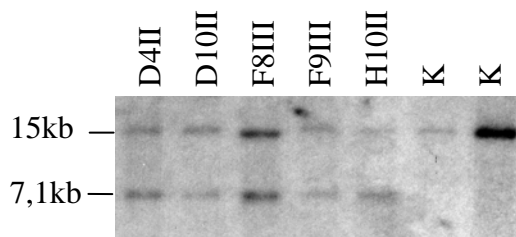
Für die homologe Integration des *ebna2*-Targeting-Vektors wurden embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Linie Bruce4 verwendet.



**Abbildung 3.40 Integration des *ebna2*-Targeting-Vektors in den *rosa26*-Lokus**

Strategie für die Insertion des *ebna2* kodierenden Gens (Die *ebna2* kodierende Sequenz wurde aus dem Plasmid GA986/20 (MABA) isoliert, Targeting Vektor siehe Appendix2) in die *XbaI*-Schnittstelle im ersten Intron des *rosa26*-Lokus. Durch die zellspezifische Expression der Rekombinase Cre kann eine Stopp- und Selektionskassette entfernt und somit die Expression des Transgens gesteuert werden. Im Schema sind außerdem die Sonden (1, 2, 3) verzeichnet, welche zum Nachweis der homologen Integration sowie der Deletion der Stopp-Kassette verwendet wurden. Die erwarteten Fragmente, die nach einem Verdau der genomischen DNA mit *EcoRI* durch die verschiedenen Sonden nachweisbar sind, wurden durch dünne Linien gekennzeichnet und mit ihren ungefähren Größen in kb beschriftet. (A) *rosa26*- Wildtyp Locus (B), *rosa26*-Lokus nach homologer Integration des EBNA2 Targeting Vektors, (C) *rosa26*-Lokus nach homologer Integration des EBNA2 Targeting Vektors und anschließender Cre vermittelter Deletion der Stopp-Kassette.

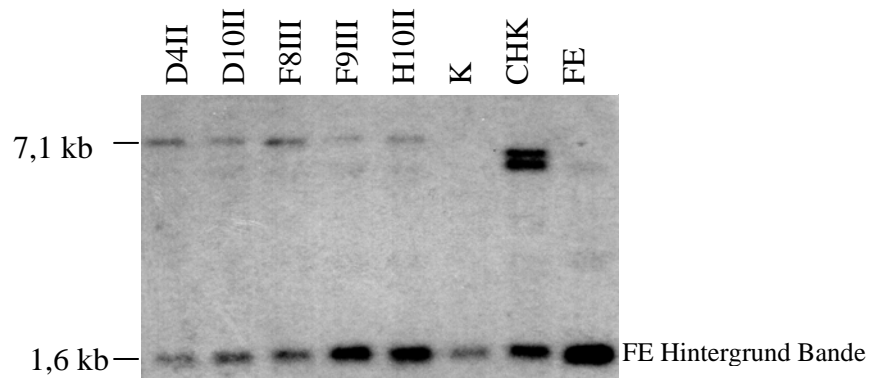
Die richtige Integration des Targeting-Vektors wurde durch Southern-Blot-Analysen anhand von drei verschiedenen Sonden nachgewiesen. Um zu überprüfen, ob EBNA2 vollständig in den Locus integriert war, wurde mit *EcoRI* gesplante DNA im Southern-Blot mit der Sonde 1 hybridisiert. Die Sonde 1 bindet an den *rosa26*-Lokus in einem Bereich, der 5' außerhalb der homologen Sequenzen des Targeting-Vektors liegt. Bei ES-Zell-Klonen, die den Targeting Vektor nicht homolog integrieren konnten, detektiert sie ein ca. 15kB großes Fragment und nach homologer Rekombination ein 7,1kb großes Fragment. Insgesamt konnte in 5 von 380 Klonen die nach homologer Rekombination erwartete 7,1kb Bande nachgewiesen werden (Abb. 3.41).



**Abbildung 3.41 Southern-Blot-Analyse zum Test der homologen Integration des EBNA2-Targeting-Vektors in den *rosa26*-Lokus mit der Sonde1**

Southern-Blot mit *EcoRI* gespaltener DNA die mit der Sonde1 (Abb. 3.40) hybridisiert wurde. Die Klone D4II, D10II, F8III, F9III und H10III sind die ES-Zell-Klone, in denen der Targeting-Vektor durch homologe Rekombination in den *rosa26*-Lokus integriert ist, was an der 7,1kb Bande zu sehen ist. Die 15kb große Bande detektierte den Wildtyp *rosa26*-Lokus. Die 15kb Bande in den Klonen mit homologer Integration des Targeting-Vektors detektiert das zweite nicht veränderte Allel. Als negative Kontrolle (K) wurde DNA von ES-Zellen ohne Integration des Vektors geladen.

Anschließend wurden die Klone, bei denen homologe Rekombination nachgewiesen worden war mit der Sonde2, die innerhalb des Vektors am Neo-Selektionsgen bindet untersucht (Abb. 3.42). Mit dieser Sonde können neben dem homolog integrierten Transgen auch zufällige Integrationen des Targeting-Vektors in das Genom der Zellen detektiert werden. Bei einer homologen Integration detektiert die Sonde ein 7,1kb großes *EcoRI*-Fragment. Bei nicht homologer Integration zeigen sich meist Fragmente anderer Größe.



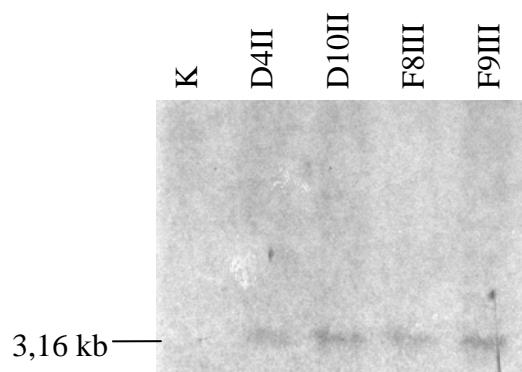
**Abbildung 3.42 Southern-Blot-Analyse zum Test der homologen Integration des EBNA2-Targeting-Vektors in den *rosa26*-Lokus mit der Sonde2**

Southern-Blot mit *EcoRI* gespaltener DNA die mit der Sonde2 (Abb.3.40) hybridisiert wurde. Die Klone D4II, D10II, F8III, F9III und H10III sind die ES-Zell-Klone, in denen der Targeting-Vektor durch homologe Rekombination in den *rosa26*-Lokus integriert ist, was an der 7,1kb Bande zu sehen ist. Als negative Kontrolle (K) wurde DNA von ES-Zellen ohne Integration des Vektors geladen. Der Klon CHK zeigt ein Beispiel einer doppelten nicht-homologen Integration des Targeting-Vektors in das Genom. In der letzten Spur ist nur DNA der Embryonalen Feeder-Zellen (EF-Zellen) geladen, auf denen die ES-Zellen kultiviert wurden. Die 1,6kb große Bande stammt vom Neomycin-Resistenzgen, welches im Genom der „Feeder-Zellen“ integriert ist. Diese Bande ist auch in den anderen Spuren zu sehen, da die ES-Zell-Klone in Kokultur mit EF-Zellen gehalten wurden.

Alle fünf Klone, in denen durch die erste Sonde homologe Rekombination gezeigt wurde, wiesen keine zusätzlichen Integrationen des Vektors auf (Abb. 3.42 Spur 1-5). Ein Beispiel für gleich zwei nicht homologe Integrationsereignisse in einem Klon, zeigt der Klon CHK (Abb. 3.42.Spur 5). In diesem Klon konnten zwei Banden detektiert werden, die kleiner als 7,1kb sind. Bei der 1,6 kb großen Bande handelt es sich um ein Fragment aus dem Neo-Selektionsgen der Embryonalen-Feeder-Zellen (EF-Zellen) (Spur 8) auf denen die ES-Zellen kultiviert wurden. Als Kontrollen wurde DNA von ES-Zellen ohne Integration des Targeting-Vektors und DNA der EF-Zellen aufgetragen. In beiden Fällen (Abb. 3.42 Spur 6 und 8) zeigte sich wie erwartet nur die 1,6 kb große Banden.

Um zu überprüfen, ob das Transgen vollständig in den *rosa26*-Lokus integriert war, wurde mit *EcoRI* geschnittene DNA der homologen Rekombinanten mit der Sonde 3 hybridisiert. Diese Sonde bindet an die *ebna2*-Sequenzen und sollte bei vollständiger Integration des Transgens ein 3,16 kb langes Fragment nachweisen. Dieses Fragment konnte wie in Abbildung 3.43 gezeigt in den Klonen D4II, D10II, F8II, F9III nachgewiesen werden, was zeigt, dass das Transgen in diesen Zellen vollständig integriert wurde.

Zur weiteren Kontrolle wurde die Targeting Kasette mit dem *ebna2* Gen über PCR aus dem Klon D10II amplifiziert und anschließend sequenziert. ES wurde sowohl die lox P flankierte Region als auch EBNA2 zwischen den beiden *AscI* Schnittstellen sequenziert. (siehe Apendix) Es konnten keine Mutationen oder Deletionen in der Sequenz des Targeting Konstruktes und *ebna2* Gens festgestellt werden.

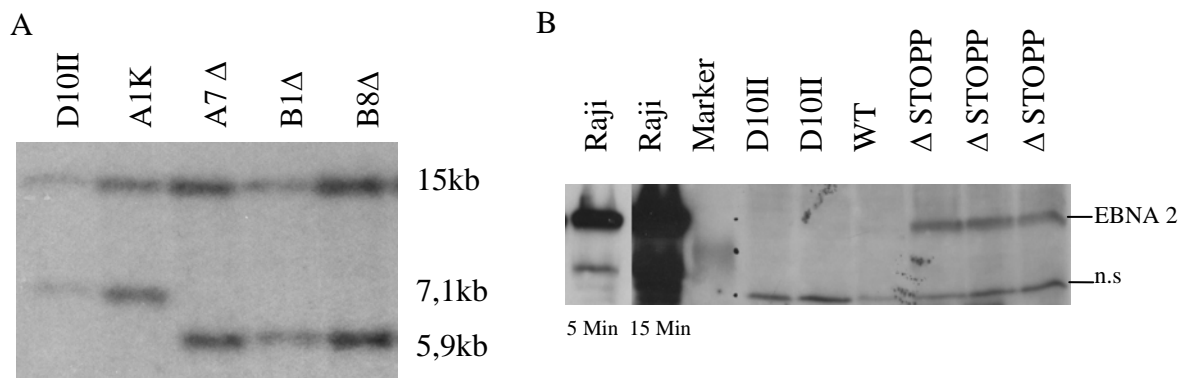


**Abbildung 3.43 Southern-Blot zum Test der vollständigen Integration des EBNA2-Transgens**

Southern-Blot mit *EcoRI* gespaltener DNA, die mit der Sonde 3 hybridisiert wurde. Die 3,16 kb große Bande zeigt ein Fragment, das sich über die gesamte Länge des *ebna2*-Gens erstreckt. In der ersten Spur ist DNA der EF-Zellen als Kontrolle (K) aufgetragen, auf denen die ES-Zellen kultiviert wurden, um mögliche Kreuzreaktionen bei den anderen Klonen mit EF-Zell-DNA ausschließen zu können.

Um sicherzustellen, dass EBNA2 nach der Deletion der Stopp-Kassette vom *rosa26*-Promotor exprimiert werden kann, wurde ein Teil der ES-Zellen des Klons D10II mit dem Cre Rekombinase Expressions-Plasmid (pGK-cre-bpA) transient transfiziert. Die Deletion der Stopp-Kassette wurde anschließend über Southern-Blot-Analysen mit der Sonde 1 überprüft (Abb. 3.41A Spuren 3-5). In Klonen mit deletiertem Stopp war in bei *EcoRI* geschnittener DNA ein 5,9 kb großes Fragment detektierbar. In Klonen, die die Stopp-Kassette noch trugen, zeigten sich 7,1 kb große Fragmente.

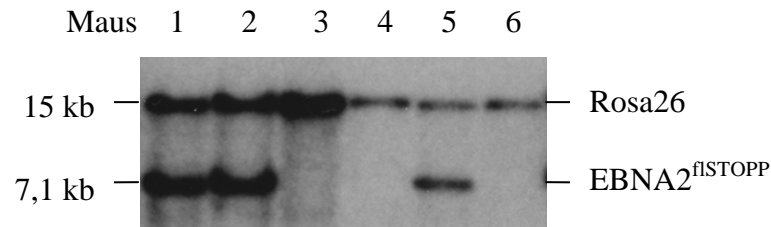
In den Zellen, die die Stopp-Kassette erfolgreich deletiert hatten, konnte die Expression von EBNA2 mittels Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden (Abb. 3.41B). In Zellen mit intakter Stopp-Kassette ließ sich das Protein wie erwartet nicht nachweisen. Als Positiv-Kontrolle wurde Proteinextrakt von EBV-positiven Raji-Zellen geladen, die EBNA2 exprimieren. Es zeigte sich, dass in den ES-Zellen weniger EBNA2 Protein detektiert werden konnte als in den Raji Zellen. Daraus konnten jedoch noch kein Rückschluss auf die Expression von EBNA2 in den B-Zellen transgener Mäuse gezogen werden, da der Rosa26-Promotor in B-Zellen möglicherweise eine andere Aktivität besitzt als in ES-Zellen.



**Abbildung 3.44 Analyse von ES-Zellen mit homologer Rekombination des Targeting-Vektors vor und nach Deletion der Stopp-Kassette durch die Rekombinase Cre**

(A) Southern-Blot mit *EcoRI* gespaltener DNA, die mit der Sonde1 hybridisiert wurde. Die Klone D10II und A1K dienen als Beispiele für Klone, in denen der Targeting-Vektor durch homologe Rekombination in den *rosa26*-Lokus integriert ist, was an der 7,1kb-Bande zu sehen ist. Die Klone A7Δ, B1Δ und B8Δ wurden nach der transienten Transfektion des Klons D10II mit dem Cre-Rekombinase-Expressions-Plasmid isoliert. Die 5,9kb großen Banden zeigen die erfolgreiche Deletion der Stopp-Kassette in diesen Klonen an. (B) Western-Blot zum Nachweis der Expression des EBNA2-Proteins in ES-Zellen nach der erfolgreichen Deletion der Stopp-Kassette (ΔSTOPP). Als Positivkontrolle wurden Lysate der EBNA2-exprimierenden Zell-Linie Raji aufgetragen. Für die Kontrolle wurden zwei Expositionszeiten dargestellt. Als negative Kontrolle wurden Lysate von Wildtyp-ES-Zellen (WT) und des Klons D10II ohne Deletion der Stopp-Kassette aufgetragen. Das Protein wurde mit dem EBNA2-spezifischen Antikörper α-EBNA2-R3 detektiert.

Die rekombinanten embryonalen Stammzellen des Klons D10II wurden in Kooperation mit Werner Müller (GBF-Braunschweig) in Mausblastozysten injiziert und scheinschwangeren Mäusen implantiert. Es wurden insgesamt acht chimäre Mäuse geboren, von denen zwei Keimzellen trugen, die von den transgenen ES-Zellen stammten. Mit diesen Mäusen konnte die Mauslinie EBNA2<sup>flSTOPP</sup> etabliert werden (Abb. 3.45).



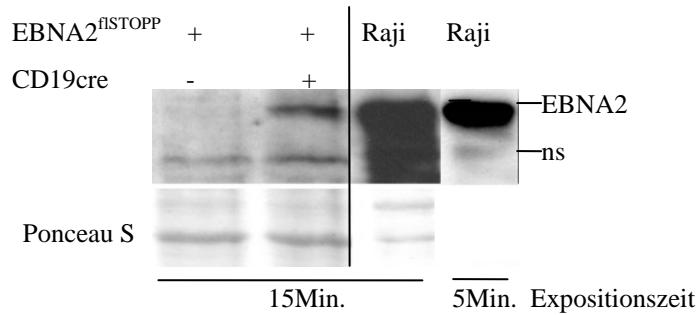
**Abbildung 3.45 Aus dem rekombinanten ES-Zellklon D10II konnte der Maustamm EBNA2<sup>flSTOPP</sup> generiert werden**

Southern-Blot mit *EcoRI* geschnittener genomischer DNA von den Nachkommen der Chimären. Für den Nachweis des Transgens wurde die DNA auf dem Blot mit der Sonde 1 hybridisiert. In Mäusen die das Transgen trugen wurde ein 7,1kb Großes Fragment nachgewiesen. Das 15 kb großen Fragmente stammen aus dem unveränderten *rosa26*-Lokus von dem jede der Mäuse zumindest ein Allel besaß.

### 3.4.3 B-Zell-spezifische Expression von EBNA2 in der Maus

Um eine B-Zell-spezifische Expression des Transgens zu erreichen, wurden die EBNA2<sup>flSTOPP</sup>-Mäuse mit transgenen CD19cre bzw. CD21cre Mäusen verpaart. Durch die Kombination mit dem CD19cre-exprimierenden Maustamm ist eine Deletion der Stopp-Kassette ab dem Pre-B-Zell-Stadium zu erwarten. Die Kreuzung von EBNA2<sup>flSTOPP</sup>-Mäusen mit CD21-Cre Mäusen führt dagegen erst in reifen B-Zellen zu einer Deletion der Stopp-Kassette (Kraus et al., 2004; Rickert et al., 1997).

Um zu überprüfen, ob die EBNA2<sup>flSTOPP</sup> transgenen Mäuse in der Lage sind, das Transgen in B-Zellen zu exprimieren, wurden B-Zellen aus den Milzen von (EBNA2<sup>flSTOPP</sup> × CD19cre)-Mäusen präpariert. In diesen B-Zellen konnte die Expression von EBNA2 im Western-Blot durch den α-EBNA2-R3-Antikörper, der den C-Terminus des Proteins erkennt, nachgewiesen werden (Abb. 3.43). In (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>)-Kontrollen konnte das Protein hingegen nicht nachgewiesen werden, was zeigt, dass die Stopp-Kassette die Expression von EBNA2 effektiv verhindert. Als positive Kontrolle wurden Proteinlysate von Raji-Zellen aufgetragen. Im Vergleich mit der Expression in Raji-Zellen wurde EBNA2 in B-Zellen der EBNA2-exprimierenden Maus wesentlich schwächer exprimiert.



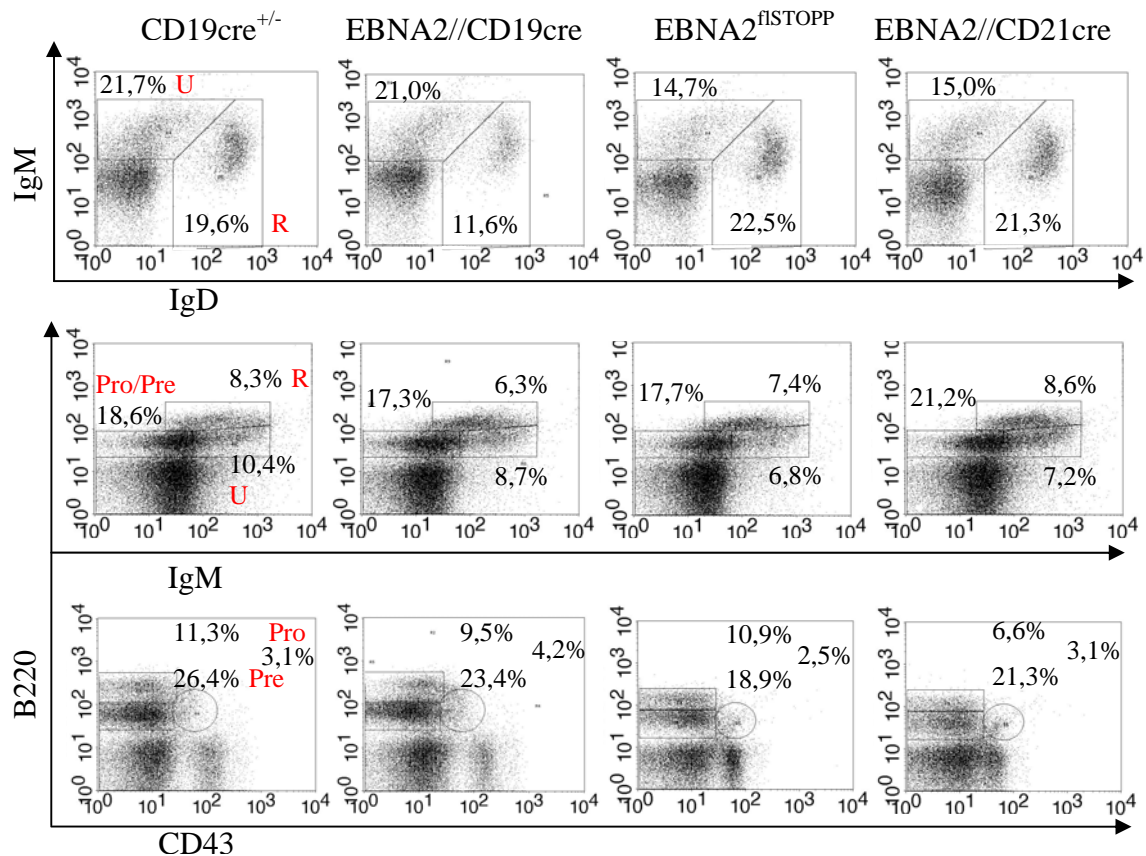
**Abbildung 3.46 Western-Blot zum Nachweis der Expression des EBNA2-Transgens in Milzzellen von (EBNA2<sup>flSTOPP</sup> xCD19cre)-Mäusen**

Zum Nachweis der Expression von EBNA2 wurden Milz-B-Zellen von (EBNA2<sup>flSTOPP</sup> xCD19cre)-Mäusen und Kontrollmäusen (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>) durch MACS-Separation isoliert und die Lysate für eine Western-Blot-Analyse eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde Protein-Lysat von EBNA2-exprimierenden Raji Zellen aufgetragen. EBNA2 wurde mit dem Antikörper  $\alpha$ -EBNA2-R3 detektiert. Die unteren Spuren zeigen die PonceauS-Färbung des oberen Blots zum Vergleich der auf dem Blot fixierten Proteinmengen. Die ersten drei Banden zeigen eine 15 minütige Exposition, die vierte Bande eine 5 minütige.

#### ***3.4.4 Die B-Zell-spezifische Expression von EBNA2 hat in 8-12 Wochen alten Mäusen keinen Einfluss auf die B-Zellentwicklung***

Um die Frage zu beantworten, ob die Expression von EBNA2 die B-Zellentwicklung beeinflusst, wurden die B-Zellpopulationen der verschiedenen lymphatischen Organe mit verschiedenen Antikörperkombinationen gefärbt und mittels FACS analysiert. Je Versuch und Genotyp wurden mindestens 5 Mäuse aus der Verpaarung der EBNA2<sup>flSTOPP</sup> mit CD19cre und 2 Mäuse aus der Verpaarung mit CD21cre-Mäusen, untersucht.

Das Knochenmark wurde durch Färbungen mit den Antikörpern IgM, IgD, CD43 und B220 untersucht. Über diese Färbungen konnte zwischen Pro-B-Zellen (IgM-B220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>), Pre-B-Zellen (IgM<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>) und den rezirkulierenden B-Zellen (IgD+IgM<sup>+</sup>B220<sup>hoch</sup>) unterschieden werden. Der Anteil der einzelnen B-Zellpopulationen im Knochenmark ist unverändert (Abb. 3.44). Lediglich die rezirkulierenden B-Zellen schienen in allen (EBNA2xCD19cre)-Mäusen tendenziell etwas verringert zu sein, was jedoch durch eine größere Anzahl von Mäusen bestätigt werden muss, da je nach Größe der Population mit einer Variation von 5-10% je Färbung gerechnet werden muss.

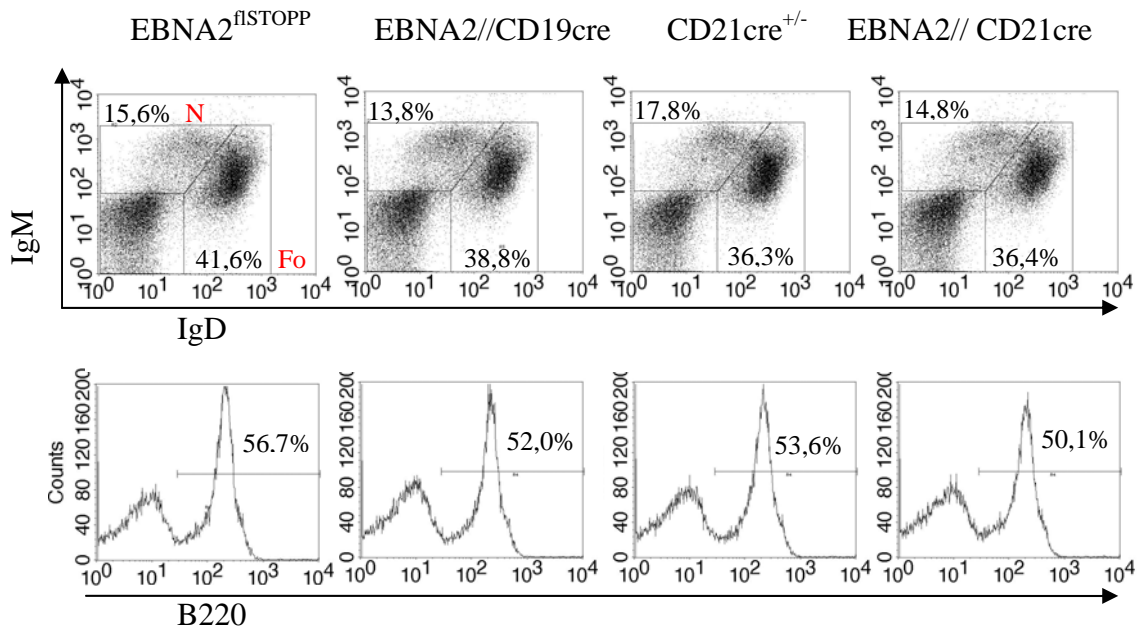


**Abbildung 3.47 Die B-Zell-spezifische Expression von EBNA2 hat keinen Einfluss auf die B-Zellentwicklung im Knochenmark**

FACS-Analysen der Zellen des Knochenmarks von (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-, (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>xCD21cre)-Mäusen (EBNA2//CD19cre; EBNA2//CD21cre) und Kontrollmäusen (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>; CD19cre<sup>+/-</sup>) mit Antikörpern gegen IgM, IgD, CD43 und B220. Oben: Die Anteile der unreifen B-Zellen (U) (IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup>) und der rezirkulierenden reifen B-Zellen (IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup>) (R) sind in Prozent angegeben. Mitte: Die Anteile der Pro- B-Zellen (IgM<sup>-</sup> B220<sup>+</sup>) (Pro), der unreifen B-Zellen (IgM<sup>+</sup> B220<sup>+</sup>) (U) und der rezirkulierenden (IgM<sup>+</sup> B220<sup>hoch</sup>) (R) sind in Prozent angegeben. Unten: Der Anteil der Pro-B-Zellen (B220<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup>) (Pro), der Pre-B-Zellen (B220<sup>+</sup> CD43<sup>-</sup>) (Pre) und der rezirkulierenden B-Zellen (B220<sup>hoch</sup> CD43<sup>-</sup>) sind in Prozent angegeben. Die ersten beiden und die letzten beiden FACS-Blots je Reihe zeigen zeitgleich angefertigte Analysen.

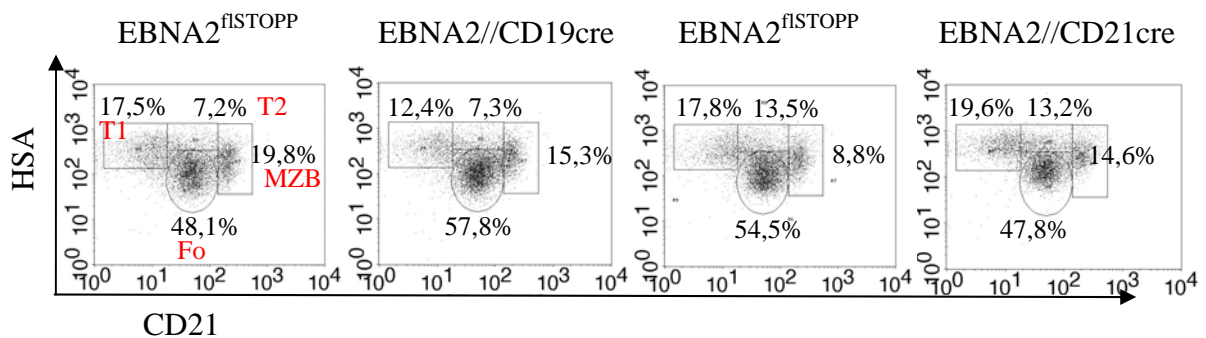
In der Milz wurde der Anteil der follikulären B-Zellen (IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup>) zu dem der transitionalen- und MZB-Zellen (IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup>) aller B-Zellen mittels IgM-, IgD- und B220-Färbungen bestimmt. Es zeigte sich, dass auch die Anteile der verschiedenen B-Zellpopulationen der Milz keine signifikanten Veränderungen aufwiesen (Abb. 3.48). Durch weitere Färbungen mit  $\alpha$ -HSA-,  $\alpha$ -CD21- und  $\alpha$ -B220-Antikörpern wurde der Anteil der T1B-Zellen (HSA<sup>hoch</sup> CD21<sup>-</sup> B220<sup>+</sup>) und T2B-(HSA<sup>hoch</sup> CD21<sup>+</sup> B220<sup>+</sup>)-Zellen in diesen Mäusen untersucht. Obwohl der Anteil der Populationen je nach Färbung variiert, konnte keine reproduzierbare Reduktion oder Expansion einer der beiden Populationen beobachtet werden (Abb. 3.49).





**Abbildung 3.48 Die B-Zell-spezifische Expression von EBNA2 hat keinen Einfluss auf die B-Zellentwicklung in der Milz**

FACS-Analysen der Milzzellen von (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-, (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>xCD21cre)-Mäusen (EBNA2//CD19cre; EBNA2//CD21cre) und Kontrollmäusen (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>; CD21cre<sup>+/-</sup>) mit Antikörpern gegen IgM, IgD und B220. Oben: Prozentangaben kennzeichnen den Anteil der naiven und transitionellen B-Zellen (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) (N) und der follikulären B-Zellen (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) (Fo). Unten: Der Anteil der B-Zellen an der gesamten Zellpopulation ist in Prozent angegeben. Die ersten beiden und die letzten beiden FACS-Blots je Reihe zeigen zeitgleich angefertigte Analysen.

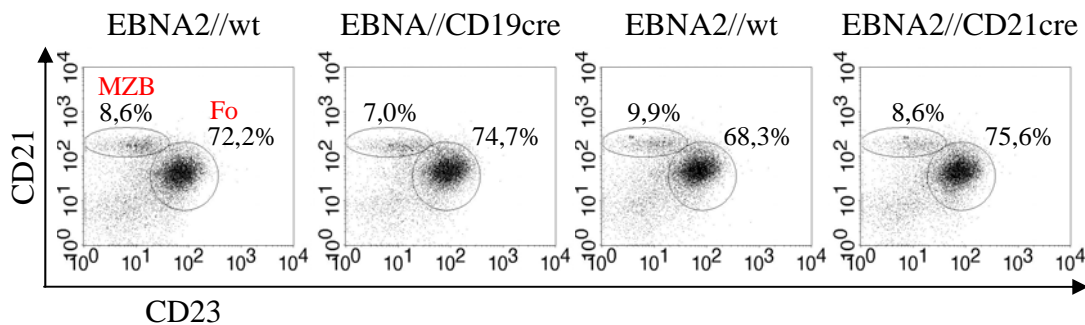


**Abbildung 3.49) Die Expression von EBNA2 in B-Zellen hat keinen Einfluss auf die Anteile der transitionalen Typ1 und Typ2 B-Zellen**

Lymphozyten der Milz von (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)- und (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>xCD21cre)-Mäusen (EBNA2//CD19cre; EBNA2//CD21cre) und Kontrollmäusen (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>) wurden in Hinblick auf ihre HSA, CD21 und B220 Expression mittels FACS-Analysen untersucht. Die FACS-Analysen zeigen nur Zellen, die im FACS positiv für den Marker B220 waren. Der prozentuale Anteil der T1B-(HSA<sup>hoch</sup>CD21<sup>low</sup>B220<sup>+</sup>), T2B-(HSA<sup>hoch</sup>CD21<sup>high</sup>B220<sup>+</sup>), MZB-(HSA<sup>hoch</sup>CD21<sup>hoch</sup>B220<sup>+</sup>) und follikulären B-Zellen (FO)(HSA<sup>low</sup>CD21<sup>high</sup>B220<sup>+</sup>) ist in den FACS-Blots markiert. Die ersten beiden und die letzten beiden FACS-Blots je Reihe zeigen zeitgleich angefertigte Analysen.

Da bekannt ist, dass Notch2 für die Entwicklung der Marginalzonen-B-Zellen benötigt wird, wäre denkbar, dass EBNA2, als potentielles Notch-homolog, einen Einfluss auf die MZB-Zellpopulation hat. Aus diesem Grund wurde der Anteil der MZB-Zellen in den EBNA2-exprimierenden Mäusen durch Färbung von CD21, CD23 und B220 bestimmt.

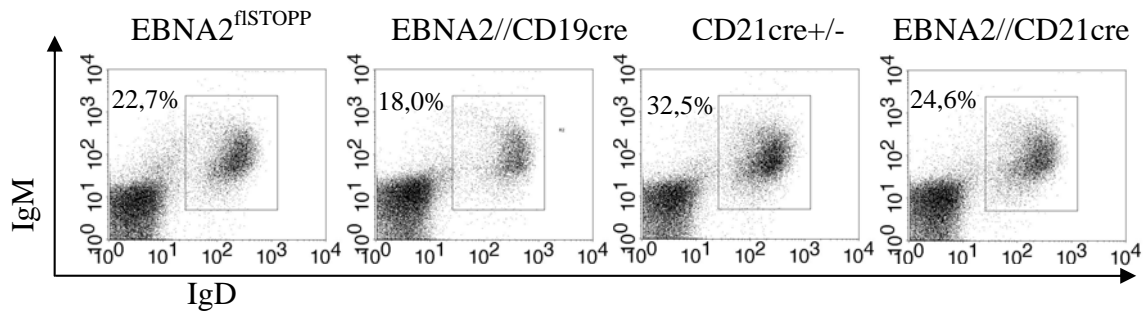
Wie in Abbildung 3.50 gezeigt, ergab sich keine deutliche Veränderung der MZB-Zellpopulation in EBNA2-exprimierenden Mäusen.



**Abbildung 3.50 Die Expression von EBNA2 in B-Zellen hat keinen Einfluss auf die MZB-Zellentwicklung**

FACS-Analysen von Einzelzellsuspensionen der Milz von (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre) (EBNA2//CD19cre) und (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>xCD21cre)-Mäusen (EBNA2//CD21cre) und entsprechenden Kontrollmäusen (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>). Diese wurden mit  $\alpha$ -CD21-,  $\alpha$ -B220-,  $\alpha$ -IgM-  $\alpha$ -CD23-Antikörpern gefärbt und mittels FACS-Analysen untersucht. In den gezeigten FACS-Blots sind nur Zellen dargestellt, die im FACS B220 und IgM positiv sind. Die Prozente zeigen den Anteil der follikulären B-Zellen (FO) (CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>) B-Zellen und der Marginalzonen-B-Zellen (MZB) (CD21<sup>+</sup>CD23<sup>niedrig</sup>) B-Zellen. Die ersten beiden und die letzten beiden FACS-Blots je Reihe zeigen zeitgleich angefertigte Analysen.

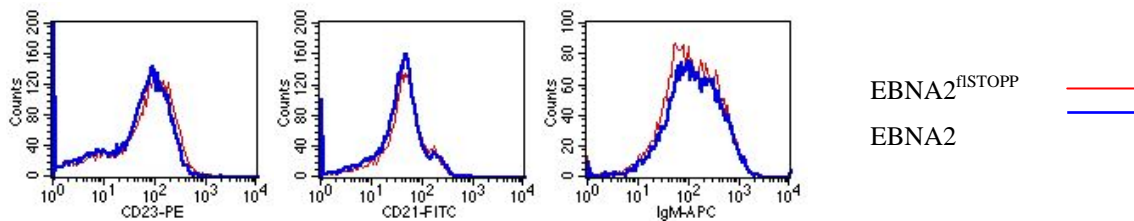
Neben der Milz wurden auch die inguinalen Lymphknoten untersucht. Der Anteil der B-Zellen an den Zellen der inguinalen Lymphknoten wurde durch eine IgM/IgD-Färbung detektiert. Wie in Abbildung 3.51 zu sehen zeigte sich auch in den inguinalen Lymphknoten keine signifikante Veränderung des B-Zell-Anteils. Im Vergleich der EBNA2-Expriemierenden Mäusen mit dne Kontrollmäusen zeigte sich jedoch tendetiell eine leichte Reduktion der Zellen, was jedoch durch eine größere Anzahl an Mäusen noch bestätigt werden muß



**Abbildung 3.51 Der Anteil der B-Zellen in den Lymphknoten wird durch EBNA2-Expression nicht verändert**

FACS-Analysen der Zellen der inguinalen Lymphknoten von (EBNA2xCD19cre)-, (EBNA2xCD21cre)-Mäusen (EBNA2//CD19cre; EBNA2//CD21cre) und Kontrollmäusen (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>; CD21cre+/-) mit Antikörpern gegen IgM und IgD. Der Anteil der B-Zellen im Lymphknoten ist in Prozent angegeben. Die ersten beiden und die letzten beiden FACS-Blots je Reihe zeigen zeitgleich angefertigte Analysen.

Da gezeigt wurde, dass EBNA2 *in vitro* in der Lage ist die Expression von CD21, CD23 und Igμ zu beeinflussen, wurde die B-Zellen der Milz auf die Expression CD21, CD23 und IgM untersucht. Es konnte jedoch keine Veränderung der Expression dieser Proteine detektiert werden.



**Abbildung 3.52 Die Expression von CD21, CD23 und IgM wird in B-Zellen durch EBNA2-Expression nicht verändert**

Lymphozyten der Milz wurden durch FACS-Analyse auf die Expression von B220 und der angegebenen Oberflächenmarker untersucht. Die Zellen stammen von altersgleichen (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen (EBNA2) und Kontrollmäusen (EBNA2<sup>flSTOPP</sup>). Die Histogramme zeigen eine Überlagerung der Expressionsstärke der jeweiligen Aktivierungsmarker der im FACS B220 positiven B-Zellen, von EBNA2-exprimierenden Zellen (blaue Linie) und Kontrollzellen (rote Linie).

## 4 Diskussion

Da EBV ätiologisch eng mit verschiedenen malignen Erkrankungen des Menschen verbunden ist, liegt ein besonderes Interesse darin, den Einfluss des Virus auf die infizierten Zellen und deren Rolle in der Tumorentstehung zu verstehen. Die meisten Erkenntnisse über die Funktionen viraler Proteine, die bei der B-Zellimmortalisierung eine Rolle spielen, stammen aus Zellkulturexperimenten. Obwohl diese Zellkulturexperimente es ermöglichten, einen schnellen und detaillierten Einblick in die Funktion einzelner viraler Proteine zu bekommen, waren sie nicht in der Lage, die immunmodulatorischen Fähigkeiten der Proteine zu erfassen. Jedoch kennzeichnet sich gerade das Immunsystem durch ein enges Zusammenspiel verschiedener Zelltypen, wie B- und T-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen, die sich zum Teil über direkte Interaktion oder durch die Sezernierung verschiedener Zytokine wie Interleukinen, Histamine, oder Interferone beeinflussen. Will man die Rolle eines Proteins in diesem komplexen Zusammenspiel im Organismus verstehen, muss man seinen Einfluss im lebenden System untersuchen. Für das Studium der EBV-Gene im Tiermodell bieten sich Mäusen an, da deren Immunsystem dem von Menschen sehr ähnlich ist.

Da Mäuse nicht direkt mit dem Epstein-Barr-Virus infiziert werden können, müssen die Gene als Transgen in das Genom der Maus integriert werden. Bisher wurden verschiedene transgene Mausstämme generiert, die EBV-Gene wie zum Beispiel EBNA1, LMP2A und LMP1 exprimieren (Caldwell et al., 1998; Kang et al., 2005; Kulwichit et al., 1998; Wilson et al., 1996). Mit Hilfe der LMP1 transgenen Mäuse konnte gezeigt werden, dass das virale Protein LMP1 den CD40-Rezeptor teilweise in seiner Funktion ersetzen kann. So war LMP1 in der Lage, ein aktives CD40 bei der Induktion des Klassenwechsels der Immunglobuline funktionell zu ersetzen. Es blockierte jedoch die Bildung von Keimzentren und die damit eng verbundene Keimzentrumsreaktion (Uchida et al., 1999). Außerdem entwickelten Mäuse, die LMP1 B-Zell-spezifisch exprimierten, B-Zell-Lymphome. Es stellte sich die Frage, ob das konstitutive Signal oder die Signaldomäne von LMP1 für diese biologischen Effekte verantwortlich ist. Daher befasste sich der erste Teil dieser Arbeit mit der Frage, inwieweit LMP1 durch die Nachahmung eines konstitutiven CD40-Signals diesem B-Zell-Phänotyp, der Inhibition der Keimzentrumsreaktion und der Entwicklung von Lymphomen führt.

#### **4.1 Generierung des transgenen Mausstammes LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> als *in vivo* Modell für ein konstitutiv aktives CD40**

Um den Einfluss eines konstitutiven CD40 Signals auf die B-Zellentwicklung zu studieren, wurde der Mausstamm LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup> generiert und die Expression von LMP1/CD40 durch die Verpaarung mit CD19Cre- und CD21Cre-Mäusen B-Zell-spezifisch aktiviert. Da die Cre-vermittelte Rekombination der Stopp-Kassette nicht in allen Zellen gleich effektiv funktioniert, wurde die Deletionseffizienz in den B-Zellen dieser Mäuse überprüft (siehe Abschnitt 3.1.1). In Knochenmarks-B-Zellen von (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen, hatten nur 49% der Zellen die Stopp-Kassette deletiert, was im Vergleich zur Effizienz in anderen Modellen relativ wenig ist. Normalerweise würde man in 75-80% der Pre-B-Zellen eine Deletion der Kassette erwarten (Rickert et al., 1997). Die geringe Deletionseffizienz deutet darauf hin, dass LMP1/CD40-exprimierende Zellen im Knochenmark negativ selektioniert werden. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass bei Mäusen, in denen der CD40-Ligand auf B-Zellen exprimiert wird, der Anteil der B-Zellen im Knochenmark reduziert ist (Martinez-Barnette et al., 2002). Die Deletionseffizienz in Milz-B-Zellen der (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)- sowie (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>x CD21cre)-Mäusen entsprach mit 90% (CD19cre) und 78% (CD21cre) der bei anderen transgenen Mäusen beobachteten Effizienz der Cre-vermittelten Rekombination (Kraus et al., 2004; Martinez-Barnette et al., 2002).

Wie durch Western-Blot-Analysen gezeigt wurde, führte die Deletion der Stopp-Kassette zu einer Expression des LMP1/CD40-Fusionsproteins, welches in den B-Zellen der (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)- sowie (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD21cre)-Mäusen nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 3.1.1).

Die Funktionalität des Proteins wurde anhand eines B-Zell-typischen physiologischen Prozesses, dem Klassenwechsel, gezeigt. LMP1/CD40 konnte genau wie ein durch CD40L aktivierter CD40-Rezeptor, nach zusätzlicher Stimulation durch IL4, in B-Zellen Klassenwechsel von IgM nach IgG1 induzieren (siehe Abschnitt 3.1.2). Diese Daten zeigen, dass die Expression von LMP1/CD40 ein Liganden-unabhängiges konstitutives CD40 Signal erzeugen kann.

B-Zellen, die durch den Klassenwechsel ihr Immunglobulin zu IgG1 gewechselt haben, exprimieren dieses oft nur für kurze Zeit auf der Zelloberfläche und differenzieren anschließend zu Immunglobulin sezernierenden Plasmazellen. Da diese klassengewechselten Zellen der Analyse im FACS entgehen, wurden die Mengen der in das Medium sezernierten Antikörper gemessen. Die Analyse der Antikörpertiter bestätigte, dass LMP1/CD40 genau

wie ein aktives CD40, in Kombination mit einer Stimulation durch IL4, die Induktion des Klassenwechsels mit anschließender Sekretion der Antikörper induziert.

## **4.2 Die Expression von LMP1/CD40 führt zu einer Reduktion der rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark**

Um zu überprüfen, ob die LMP1/CD40-Expression die frühe B-Zellentwicklung beeinflusst, wurden die Zellen des Knochenmarks auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker mittels FACS-Analysen untersucht (siehe Abschnitt 3.1.4). Es zeigte sich, dass die Expression des Fusionsproteins zu keiner Veränderung der Verhältnisse der frühen B-Zellpopulationen führt. Sowohl Pro-, Pre- als auch unreife B-Zellen waren in normalen Anteilen vorhanden. Lediglich die niedrige Deletionseffizienz im Knochenmark der (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäuse weist darauf hin, dass es während der frühen B-Zellentwicklung zu einer negativen Selektion von LMP1/CD40-exprimierenden Zellen kommen könnte. Falls dies tatsächlich der Fall ist, wären alle Populationen gleichermaßen betroffen. Auffallend war, dass in allen LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen der Prozentsatz der rezirkulierenden B-Zellen stark vermindert war. Dieser Phänotyp trat sowohl in CD19cre als auch in CD21cre Mäusen auf. Dies lässt vermuten, dass die LMP1/CD40-Expression in reifen B-Zellen verhindert, dass diese aus der Peripherie ins Knochenmark zurückkehren können, und steht wahrscheinlich mit der Aktivierung der LMP1/CD40-exprimierenden Zellen in Zusammenhang. Beispielsweise wurde beschrieben, dass eine Aktivierung von CD40 die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 induziert (Basso et al., 2004). Diese den „Homing“-Faktoren zuzuordnenden Proteine sind dafür verantwortlich, dass die B-Zellen in die primären Follikel der Milz gelangen und dort gehalten werden (Forster et al., 1996; Forster et al., 1999). Falls eine normale Regulation dieser Proteine in LMP1/CD40-exprimierenden Zellen nicht mehr möglich ist, könnte dies erklären, warum diese Zellen nicht mehr ins Knochenmark zurückkehren können.

## **4.3 Ein konstitutiv aktives CD40-Signal führt zu einer Expansion und Aktivierung der peripheren B-Zellen**

Im Gegensatz zu dem relativ schwachen Phänotyp im Knochenmark führte die Expression von LMP1/CD40 sowohl nach Kreuzung mit CD19-cre- als auch mit CD21-cre-Mäusen zu einer stark ausgeprägten Splenomegalie (siehe Abschnitt 3.1.3.). In histologischen Schnitten konnte gezeigt werden, dass die Follikel dieser Milzen stark vergrößert waren, deren struktureller Aufbau jedoch mit einer deutlich abgegrenzten B-, T- und Marginal-B-Zellzone

erhalten blieb (siehe Abschnitt 3.1.3, 3.1.5). Durch FACS-Analysen wurde gezeigt, dass sowohl die B- als auch die T-Zellpopulation vergrößert war, wobei die Gesamtzahl der B-Zellen in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen um das Sechsfache und die der T-Zellen um das Dreifache erhöht war (siehe Abschnitt 3.1.3). Die Expansion der B-Zellen beschränkte sich hauptsächlich auf die reifen B-Zellen. Dies war daran zu erkennen, dass der Anteil der MZB ( $\text{HSA}^{\text{hoch}}\text{CD21}^{\text{hoch}}\text{B220}^+ \text{CD23}^{\text{niedrig}}$ ) und follikulären B-Zellen ( $\text{HSA}^+\text{CD21}^+\text{B220}^+\text{CD23}^+$ ) im Verhältnis zu den gerade aus dem Knochenmark ausgewanderten transitionalen B-Zellen, die sogar leicht reduziert waren, ( $\text{HSA}^{\text{hoch}}\text{CD21}^{+/+}\text{B220}^+$ ) massiv zunahm (siehe Abschnitt 3.1.5).

Wie in der Milz war auch in den inguinalen Lymphknoten der Anteil der B-Zellen stark erhöht. In beiden Organen hatten die B-Zellen einen aktivierten Phänotyp, wie anhand der erhöhten Expression von Adhäsionsproteinen und Aktivierungsmarkern wie ICAM1, MHCII, CD80, CD86, CD95 und der Zunahme der Zellgröße nachgewiesen wurde (siehe Abschnitt 3.1.7).

Auf Grund der starken Expansion der B-Zellen in der Milz und den Lymphknoten stellte sich die Frage, ob die Expansion der B-Zellen durch verlängertes Überleben oder durch eine verstärkte Proliferation hervorgerufen wurde. Es zeigte sich, dass im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen ein Teil der LMP1/CD40-exprimierenden Zellen bereits ohne Stimulation proliferierten (siehe Abschnitt 3.1.9). Ihr Anteil konnte durch die Stimulation mit IL4 und agonistischen CD40-Antikörpern noch weiter gesteigert werden. Der Befund, dass nur ein Teil der LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen in Kultur spontan proliferierten, lässt vermuten, dass nur bestimmte B-Zellpopulationen durch LMP1/CD40 zur Proliferation angeregt werden konnten. Es könnte jedoch auch sein, dass nur Zellen proliferieren konnten, die vor der Isolation z.B. durch Antigenkontakt, Zell-Zell-Interaktion oder Zytokine präaktiviert worden waren. Es zeigte sich außerdem, dass in der *in vitro*-Kultur primäre LMP1/CD40-exprimierende Zellen nicht nur proliferierten, sondern auch besser überlebten. So blieb der Anteil der lebenden Zellen in Kulturen mit LMP1/CD40-exprimierenden Zellen über fünf Tage relativ konstant und zeigte sogar eine leichte Zunahme der Zellzahl während der ersten Tage. Der Anteil der lebenden Kontroll-Zellen sowie deren Gesamtzahl war hingegen nach fünf Tagen drastisch reduziert. Erst durch die Aktivierung des CD40 Rezeptors blieb auch der Anteil der lebenden Kontrollzellen über fünf Tage annähernd konstant.

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Expansion des B-Zell-Pools in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen sowohl durch ein verbessertes Überleben als auch durch eine leichte Proliferation der B-Zellen verursacht wird.

Es stellte sich die Frage, welche Signale in LMP1/CD40-exprimierenden Zellen diesen Phänotyp hervorrufen. Es ist bekannt, dass sowohl LMP1 als auch CD40 über die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges antiapoptotische Gene induzieren, die zum längeren Überleben der Zellen beitragen könnten (Li and Chang, 2003; Schauer et al., 1996; Siebelt et al., 1997). Auch konnte gezeigt werden, dass NF $\kappa$ B Einfluss auf die Proliferation von Zellen durch die Regulation von Cyclinen haben kann (Guttridge et al., 1999; Hinz et al., 1999). Es lag daher nahe, die NF- $\kappa$ B-Aktivität in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen zu untersuchen. Da CD40 sowohl den kanonischen Signalweg als auch den nicht-kanonischen NF $\kappa$ B-Signalweg aktivieren kann (Berberich et al., 1994; Coope et al., 2002; Grech et al., 2004; Hauer et al., 2005), wurde die Aktivität beider Wege überprüft.

Überraschenderweise war der kanonische NF $\kappa$ B-Signalweg in LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen nicht aktiver als in den Kontrollen. Stattdessen war im Vergleich zu ruhenden B-Zellen der nicht-kanonische NF $\kappa$ B-Weg aktiviert. Während die Stimulierung des CD40-Rezeptors in Kontroll-Zellen wie erwartet zu einer starken Aktivierung des kanonischen Signalweges und zu einer schwachen Induktion des nicht-kanonischen Signalkomplexes führte, konnte nach Stimulation des endogenen CD40-Rezeptors in LMP1/CD40-exprimierenden Zellen nur eine geringfügige Steigerung der Aktivität des kanonischen NF $\kappa$ B-Wegs nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.1.10).

Da die Signaldomänen von CD40 und LMP1/CD40 übereinstimmen, könnte der Unterschied in der Aktivierung dieser Wege in der Länge des Signalimpulses liegen. Momentan wird noch untersucht, ob eine kurzfristige Aktivierung des CD40-Rezeptors zunächst den kanonischen und später den nicht-kanonischen Signalweg aktivieren kann. Die Tatsache, dass die Stimulation des CD40-Rezeptors in LMP1/CD40-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen zu einer weit aus geringeren Aktivierung des kanonischen Signalweges führte, könnte außerdem darauf hinweisen, dass der nicht-kanonische NF $\kappa$ B-Signalweg die Induktion des kanonischen Signalwegs negativ reguliert. In LMP1-exprimierenden Mäusen wurde eine starke Induktion der NF $\kappa$ B-Aktivität in B-Zellen beobachtet. Es wurde jedoch bisher nicht näher untersucht, welche NF $\kappa$ B-Komponenten an dieser Aktivierung beteiligt sind. Da auch LMP1 sowohl den nicht-kanonischen als auch den kanonischen Signalweg aktivieren kann (Luftig et al., 2003; Sylla et al., 1998; Xie et al., 2004), wäre es von Interesse zu untersuchen, welchen Beitrag der nicht-kanonische Signalweg zur NF $\kappa$ B-Aktivierung in LMP1-exprimierenden B-Zellen leistet.

Nachdem gezeigt wurde, dass der Anteil der reifen B-Zellen (B2-Zellen) der Milz und der Lymphknoten stark zugenommen hatte, wurden auch die Zellen der Peritonealhöhle näher



untersucht. Im Gegensatz zu der Milz und den Lymphknoten waren die B2-Zellen in der Peritonealhöhle nicht signifikant vermehrt (siehe Abschnitt 3.1.3). Überraschenderweise waren die B1-Zellen, die den Hauptanteil der B-Zellen in der Peritonealhöhle ausmachen, stark vermindert (siehe Abschnitt 3.1.6). Was zu der Reduktion der B1-Zellen führt, ist gegenwärtig noch unklar. Die LMP1/CD40-Expression könnte möglicherweise die frühe Entwicklung der B1-Zellen beeinträchtigen, was jedoch eher unwahrscheinlich ist, da die B1-Zellen sowohl in (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre) als auch in (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD21cre)-Mäusen fehlten. Weiter bestehen die Möglichkeiten, dass die B1-Zellen durch die LMP1/CD40-Expression negativ selektioniert wurden, oder auf Grund von Aktivierung die Peritonealhöhle verlassen haben. Letztere Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass durch ein CD40-Signal B1-Zellen aktiviert werden können (Kaneko et al., 1996). Für die darauf folgende Proliferation und Differenzierung zu IgA-exprimierenden Plasmazellen müssen sie die Peritonealhöhle verlassen und in die Milz oder in die mesenteriale Lymphknoten wandern (Fagarasan et al., 2000; Kroese et al., 1989), wo sie hauptsächlich zu IgA-produzierenden Plasmazellen differenzieren. Im Serum der LMP1/CD40-exprimierenden Mäuse wurden allerdings keine erhöhten IgA-Spiegel beobachtet. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Zellen zwar in die Milz oder in die Lymphknoten einwandern, aber wegen ihres durch das konstitutive CD40-Signal verursachten aktiven Zustandes nicht in der Lage sind, zu reifen Plasmazellen zu differenzieren und deshalb als aktivierte B-Zellen in diesen Organen bleiben. Unter diesen Umständen wären die Zellen nur schwer als ehemalige B1-Zellen zu erkennen, da sie typische Marker wie Mac1 und CD5 nicht mehr exprimieren, sobald sie die Peritonealhöhle verlassen (Kantor et al., 1995).

Erstaunlicherweise führte die B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 nicht nur zur Expansion von B- sondern auch von T-Zellen, an der CD4- und CD8- positive T-Zellen beteiligt waren (Abschnitt 3.1.3). Weitere FACS-Analysen zeigten, dass die T-Zellen einen aktivierten Phänotyp haben (Abschnitt 3.1.7). Ein vergleichbarer Phänotyp wurde von Koschella und Kollegen bei Wildtyp-Mäusen nach der Injektion von agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern beobachtet. In diesen kam es durch das CD40-Signal zur einer Aktivierung von antigenpräsentierenden-Zellen, die wiederum eine Expansion der CD4- und CD8-positiven Gedächtnis-T-Zellen induzierten (Koschella et al., 2004). In den hier beschriebenen LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen könnte es daher durch die verstärkte Expression von MHCII auf den B-Zellen, die zu den antigenpräsentierenden Zellen gehören, zu einer Stimulation der T-Zellen kommen. Auch die erhöhte Expression von CD86 und ICAMI in LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen könnte an dieser verstärkten Aktivierung der T-Zellen

durch B-Zellen beteiligt sein, da sie bei der B-Zell-T-Zell Interaktion eine wichtige Rolle spielen (Cosgrove et al., 1991; Stel et al., 2004).

#### **4.4 Ein konstitutives CD40 Signal blockiert die Keimzentrumsreaktion**

Eine wichtige Frage, die dieser Arbeit zu Grunde liegt, ist, ob die konstitutive Aktivität oder die Signaldomäne von LMP1 die Keimzentrumsreaktion blockiert. Um diese Frage zu beantworten, wurden LMP1/CD40-exprimierende Mäuse mit dem T-Zell-abhängigen Antigen NP<sub>17</sub>-CGG immunisiert. Wie hier gezeigt wurde, hemmt auch die Expression von LMP1/CD40 die Keimzentrumsreaktion (Abschnitt 3.2.1-3). Dies legt die Vermutung nahe, dass nicht spezielle Eigenschaften der Signaldomäne, sondern die konstitutive Aktivität von LMP1 dafür verantwortlich ist, dass nach T-Zell-abhängiger Immunisierung keine Keimzentren gebildet werden können.

Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Expression des reziproken Fusionsproteins, bestehend aus der Liganden-Bindedomäne des CD40-Rezeptors und der Signaldomäne von LMP1 in CD40-defizienten-Mäusen zur Bildung von Keimzentren führt (Stunz et al., 2004). Dadurch wird die Hypothese nahe gelegt, dass nach der Aktivierung der B-Zellen durch ein CD40-Signal dieses unterbrochen werden muss, damit eine B-Zelle in eine Keimzentrumsreaktion eintreten kann. Diese Hypothese wird von drei weiteren Beobachtungen untermauert. (i) Es wurde gezeigt, dass die gleichzeitige Injektion von agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern und T-Zell-abhängigem Antigen zur Blockierung der Keimzentrumsreaktion führt (Erickson et al., 2002). Auch hier könnte durch die agonistischen  $\alpha$ -CD40-Antikörper eine langzeitige Stimulierung stattfinden und dadurch die Unterbrechung des CD40-Signals verhindert werden. (ii) In Gen-Expressionsstudien von Keimzentrums-B-Zellen wurde nachgewiesen, dass Zentroblasten keine CD40-Signatur aufweisen (Basso et al., 2004). (iii) Es konnte gezeigt werden, dass durch CD40-Signale die Transkription von *bcl-6*, ein für die Keimzentrumsreaktion wichtiger Transkriptionsfaktor, inhibiert wird (Allman et al., 1996).

Infolge der Abwesenheit der Keimzentren konnten in den LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen nur sehr wenige hochaffine Antikörper nachgewiesen werden. Die verbleibenden hochaffinen Antikörper stammen wahrscheinlich von den wenigen Zellen, die nicht in der Lage waren, die Stopp-Kassette zu deletieren.

Erstaunlicherweise waren nach T-Zell-abhängiger Immunisierung nicht nur die Titer der hochaffinen IgG1-spezifischen NP-Antikörper sondern auch die der niederaffinen NP-

spezifischen IgM- und IgG1-Antikörper reduziert (siehe Abschnitt 3.2.4). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, dass LMP1-exprimierenden Mäuse nur die Bildung von hochaffinen, nicht jedoch die von niederaffinen Antikörpern nach T-Zell-abhängiger Immunisierung inhibiert. Es zeigte sich auch, dass LMP1/CD40 nicht im Stande war, wie LMP1 in den B-Zellen CD40-defizienter-Mäuse den extrafollikulären Klassenwechsel zu initiieren. Dies könnte auf Unterschiede der Signaldomänen von LMP1 und CD40 zurückzuführen sein. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass LMP1/CD40-exprimierende Zellen die Fähigkeit verloren haben, mit T-Zellen zu interagieren und somit die co-stimulatorischen Faktoren, wie z.B. IL4 oder IL-10 fehlen, die für einen Klassenwechsel notwendig sind (Kawanishi and Joseph, 1991; Kindler and Zubler, 1997). Diese Vermutung wird von dem hier gezeigten Ergebnis gestützt, dass Milzzellen LMP1/CD40-exprimierender Mäuse *in vitro* nach Zugabe von IL4 durchaus in der Lage sind einen Klassenwechsel zu IgG1 durchzuführen (siehe Abschnitt 3.1.2). Dies deutet darauf hin, dass LMP1-exprimierende B-Zellen im Gegensatz zu LMP1/CD40-exprimierenden entweder trotz des konstitutiven Signals in der Lage sind mit T-Zellen zu interagieren, oder dass durch Unterschiede in der Signaldomäne LMP1 ohne co-stimulatorische Signale Klassenwechsel induzieren kann. Erste Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe, die zeigen dass LMP1- im Gegensatz zu CD40 ohne die Zugabe von IL4 einen Klassenwechsel von IgM zu IgG1 induzieren kann, unterstützen diese Hypothese (Julia Rastelli, persönliche Mitteilung).

Insgesamt lässt sich aus den Resultaten, die nach Immunisierung LMP1/CD40-exprimierender Mäuse mit T-Zell abhängigem Antigen erhoben wurden, schließen, dass B-Zellen bei Antigenkontakt nur für kurze Zeit die Stimulation durch das CD40-Signal benötigen, um aktiviert zu werden. Das Signal muss jedoch für die Einleitung der Keimzentrumsreaktion unterbrochen werden.

Im Gegensatz zu der Milz, in der auch nach Immunisierung keine Keimzentren nachgewiesen werden konnten, zeigten sich in den Peyerschen Plaques spontane Keimzentren (siehe Abschnitt 3.2.2). Diese Keimzentren werden möglicherweise von B-Zellen gebildet, die nicht in der Lage waren, die Stopp-Kassette zu deletieren. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Keimzentrumsbildung in Peyerschen Plaques auf einem anderen oder abgewandelten Mechanismus beruht, der nicht von einem konstitutiven CD40-Signal blockiert werden kann. Die Beobachtung, dass CD19-defiziente Mäuse Keimzentren in den Peyerschen Plaques bilden, obwohl sie nach T-Zell-spezifischer Immunisierung nicht in der Lage sind Keimzentren in der Milz zu entwickeln, zeigt, dass es Unterschiede bei der Formierung von

Keimzentren in den Peyerschen Plaques und in der Milz geben muss (Gardby and Lycke, 2000). Wo diese Unterschiede liegen, ist bislang noch nicht genau bekannt.

Kürzlich publizierten Panagopoulos und Kollegen Ergebnisse einer transgene Mauslinie (LMP1/CD40-CD19), bei der LMP1/CD40 unter der Kontrolle des CD19-Promotors-exprimiert wird (Panagopoulos et al., 2004). Auch diese Mäuse konnten nach TD-Immunisierung keine Keimzentren ausbilden, entwickelten aber im Gegensatz zu den hier untersuchten (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen spontane Autoimmunerkrankungen, wie anhand von hohen Antikörper-Titern gegen DNA nachgewiesen werden konnte. Infolgedessen kam es in den Nieren dieser Tiere zu Ablagerungen von IgG1-Immunkomplexen und zu perivaskulären Entzündungen in der Leber. Der Unterschied im Phänotyp der beiden LMP1/CD40-exprimierenden Mausstämme könnte entweder in der Expressionsstärke oder in dem Zeitpunkt der Expression des Transgens liegen. Es ist anzunehmen, dass in (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen das Transgen erst später während der B-Zellentwicklung exprimiert als in den LMP1/CD40-CD19 Mäusen. Während in dem von Panagopoulos und Kollegen beschriebenen klassischen transgenen Mausstamm die Expression von LMP1/CD40 direkt vom CD19-Promotor gesteuert wird, muss bei den hier untersuchten (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen zunächst die Rekombinase Cre vom CD19-Promotor exprimiert werden, die anschließend eine Deletion der Stopp-Kassette vermittelt, und erst danach zu einer Expression von LMP1/CD40 führen kann.

Da bekannt ist, dass ein starkes CD40-Signal die BCR-vermittelte Apoptose von unreifen B-Zellen verhindern kann (Rolink et al., 1998), ist vorstellbar, dass die LMP1/CD40-Expression in unreifen B-Zellen mit der negativen Selektion von autoreaktiven B-Zellen im Knochenmark interferiert. Es ist denkbar, dass in (LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>xCD19cre)-Mäusen das Transgen zu schwach exprimiert wird, um eine negative Selektion autoreaktiver Zellen zu verhindern. Außerdem ist der Anteil der unreifen B-Zellen, die das Transgen exprimieren, bedingt durch die schlechte Deletionseffizienz im Knochenmark geringer, wodurch die Wahrscheinlichkeit, eine Autoimmunität zu entwickeln, sinkt.

Überraschenderweise sahen Panagopoulos und Koautoren in den von ihnen generierten Mäusen eine Verminderung der follikulären B-Zellen, was im direkten Gegensatz zu dem Phänotyp der hier beschriebenen Maus steht. Die starke Zunahme der follikulären B-Zellen, die hier gezeigt wurde, entspricht jedoch eher der von CD40 bekannten Funktion, *in vitro* Proliferation und Überleben von B-Zellen zu fördern (Banchereau and Rousset, 1991). Ein Grund für diese beobachteten Unterschiede könnte die für die LMP1/CD40-CD19

beschriebene Autoimmunität sein, welche den Phänotyp dieser Mäuse dominiert und für die Akkumulation von Makrophagen und polymorph kernigen Zellen in der Milz sorgt.

Trotz der Unterschiede zeigten sowohl die hier vorgestellten Mäuse als auch die LMP1/CD40-CD19-Mäuse, dass ein konstitutives CD40-Signal genau wie ein LMP1-Signal die Keimzentrumsreaktion blockiert und eine Unterbrechung des Signals für die Keimzentrumsreaktion und die Differenzierung von B-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen notwendig ist. Demzufolge kann eine EBV-infizierte Zelle nur in das Keimzentrum eintreten, wenn das LMP1-Signal kurzfristig unterbrochen oder erst nach der Initiation der Keimzentrumsreaktion angestellt wird. Es stellt sich nun die Frage, welchen Effekt LMP1 durch die Imitation eines konstitutiven CD40 Signals in Keimzentrumszellen hat. Es wäre möglich, dass seine Expression in Keimzentrumszellen ebenfalls mit der Keimzentrumsreaktion interferiert, da es das für die Reaktion wichtige Protein Bcl-6 negativ reguliert. Es wäre jedoch auch denkbar, dass es das Überleben der B-Zellen verlängert und somit die negative Selektion in der Keimzentrumsreaktion stört. Dadurch könnte es zu einer Akkumulation oder auch ungesteuerten Proliferation der Zellen kommen.

Um dieser Frage nachzugehen sollen LMP1/CD40<sup>flSTOPP</sup>-Mäuse mit Mäusen verpaart werden, die die Rekombinase Cre erst in Keimzentrumszellen exprimieren.

#### **4.5 Die B-Zell spezifische Expression von LMP1/CD40 führt in 12-18 Monaten alten Mäusen zur Entstehung von Lymphomen**

Es stellte sich die Frage, ob die erhöhte Proliferation und das verlängerte Überleben von LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen langfristig die Akkumulation von genetischen Aberrationen begünstigt und so zur Tumorentstehung führt.

In der Tat entwickelten 31% der LMP1/CD40-exprimierenden Mäuse im Alter zwischen 12 und 18 Monaten Anzeichen lymphoproliferativer Erkrankungen, die sich deutlich von den bei jungen LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen beobachteten lymphoproliferativen Veränderungen unterschieden (siehe Abschnitt 3.3).

Die Erkrankungen wurden anhand des Organbefalls in zwei Gruppen eingeteilt. Die Mäuse der Gruppe I zeigten einheitlich eine ausgeprägte Hepatosplenomegalie sowie eine Lymphadenopathie. Die Mäuse der Gruppe II hatten ebenfalls eine Lymphadenopathie entwickelt, jedoch im Gegensatz zu der Gruppe I nur eine leichte Splenomegalie bei makroskopisch unauffälliger Leber. Um zu überprüfen, ob diese Mäuse tatsächlich maligne Erkrankungen entwickelt hatten, und die beobachteten Veränderungen nicht nur auf eine

fortschreitende Expansion der LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen zurückzuführen ist, wurden sie zunächst immunophänotypisch charakterisiert.

Bei den Mäusen der Gruppe I war die Gesamtzahl der B- sowie der T-Zellen stark erhöht, wobei deren Verhältnis zueinander variierte. Die in den meisten Fällen deutlich vergrößerten B-Zellen waren immer IgM und/oder IgD positiv, exprimierten jedoch weder CD21 noch CD23. Diese Proteine werden typischerweise auf follikulären B-Zellen exprimiert und wurde auch auf den B2-Zellen der jungen LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen nachgewiesen. In zwei der erkrankten Mäuse exprimierten die B-Zellen außerdem kein B220 (siehe Abschnitt 3.3.1, 3.3.2). Ferner war in den Milzen die normale Milzarchitektur, die in jungen LMP1/CD40-exprimierenden Mäusen gut erkennbar war, durch Infiltration einer homogenen B-Zellpopulation zerstört, die in FACS-Analysen einen einheitlichen Immunophänotyp zeigte. Auch im Knochenmark konnte in einigen Fällen die Infiltration durch diese Population nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.3.3).

Die Veränderung der Oberflächenmarker, die Verdrängung der Zellen der normalen Milzfollikel, die Zunahme der B- und T-Lymphozyten in der Milz und den Lymphknoten sowie der Befall extranodaler Organe, wie die beobachtete Hepatomegalie, sind typische Anzeichen von Lymphomerkrankungen (Morse et al., 2002).

In zwei von sieben Fällen konnte gezeigt werden, dass die expandierte B-Zellpopulation klonal ist. (siehe Abschnitt 3.18). Dies zeigt, dass diese Mäuse Lymphome entwickelt haben, die durch genetische Ereignisse in einzelnen Zellen zu einer Verdrängung der restlichen B-Zellen führte.

Aufgrund der großen Ähnlichkeit des Phänotyps der Mäuse der ersten Gruppe kann vermutet werden, dass die übrigen Mäuse ebenfalls Lymphome entwickelt haben. Diese haben sich eventuell bis jetzt dem Nachweis entzogen, da sie nicht monoklonal sondern oligoklonal sind. Da die bisher verwendete Methode zum Nachweis der Klonalität nicht sehr sensitiv war, sollen weitere Analysen durchgeführt werden, die zeigen werden, ob auch diese Mäuse dominante B-Zell-Klone besaßen. Außerdem soll untersucht werden, ob die Transformation der Zellen durch spezielle genetische Ereignisse hervorgerufen wurden.

Für die Klassifizierung der beobachteten Lymphome wurden die Gewebe histologisch untersucht (siehe Abschnitt 3.3.6-7). Bei allen sechs begutachteten Fällen handelte es sich morphologisch um follikuläre Lymphome, die den beim Menschen auftretenden follikulären Lymphomen der Klasse I sehr stark ähnelten und wie diese von einer großen Zahl reaktiver T-Zellen durchsetzt waren. Da follikuläre Lymphome in den meisten Fällen von Keimzentrumszellen wie Zentroblasten und Zentrozyten abstammen, jedoch LMP1/CD40-

Mäuse nicht in der Lage sind, Keimzentren zu bilden, stellt sich die Frage, aus welchen Zellen diese Lymphome hervorgegangen sind. Es ist denkbar, dass durch das konstitutive CD40-Signal in B-Zellen ein Keimzentrumszell-ähnlicher Phänotyp erzeugt wird. Es soll daher in weiteren Versuchen überprüft werden, ob die Zellen dieser Lymphome BCL-6, CD10 und AID, Marker die man typischerweise in Keimzentrumszellen findet, exprimieren, (Greiner et al., 2005; Muto et al., 2000; Niu, 2002). Auch der Nachweis von somatischer Hypermutation, einem keimzentrumsspezifischen Prozess, in den AID involviert ist, könnte einen Hinweis auf einen Keimzentrumsphänotyp der Zellen geben (Muramatsu et al., 2000).

Die bei diesen Mäusen beobachteten follikulären Lymphome sind denen beim Menschen auftretenden follikulären Lymphomen morphologisch sehr ähnlich. Follikuläre Lymphome gehören beim Menschen mit 20-30% zu den am häufigsten diagnostizierten Neoplasien reifer B-Zellen. In 70-95% der Fälle sind sie mit einer Translokation von *BCL2* in den *Ig*-Lokus assoziiert.

BCL-2 wird normalerweise von ruhenden B- und T-Zellen, jedoch nicht von normalen Keimzentrumszellen, exprimiert (zur Übersicht Jaffe et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass BCL-2 direkt an der Transformation von Zellen beteiligt ist. So führt die Überexpression von BCL-2 *in vitro* zu einer verbesserten Überlebensrate von B-Zellen und die Expression in transgenen Mäusen zur Entwicklung von massiven follikulären Lymphomen (McDonnell et al., 1989; Nunez et al., 1990). Da CD40 in der Lage ist, Mitglieder der BCL2-Familie, wie BCL2 selber und BCL-x zu induzieren (Ishida et al., 1995; Tuscano et al., 1996), wird es sehr interessant sein, ob es in den hier beschriebenen Tumoren ebenfalls zu einer starken Expression von BCL2 kommt.

Falls weitere Untersuchungen ergeben, dass in den hier beschriebenen Tumoren, die für die humanen follikulären Lymphome beschriebenen typischen Marken BCL2, CD10 und BCL-6 exprimiert werden, könnten diese Mäuse als gutes Modell für menschliche follikuläre Lymphome dienen.

Die Mäuse der zweiten Gruppe sind phänotypisch heterogener. In einem Fall könnte sich ein T-Zell-Lymphom entwickelt haben, das bislang jedoch noch nicht näher charakterisiert wurde (siehe Abschnitt 3.3.1-2). Auch der andere Fall muss noch weiterführend untersucht werden.

Bei fast allen Mäusen, die ein Lymphom entwickelt hatten, trat zusätzlich ein Tumor im Halsbereich auf. In der histologischen Untersuchung stellte sich diese Tumor als gering differenziertes Karzinom der Speicheldrüse dar. Auffällig war die starke Ähnlichkeit zu den

beim Menschen auftretenden lymphoepitheliom-artigen Karzinomen der submandibularen Speicheldrüse, die in hohem Maße mit EBV assoziiert sind und LMP1 stark exprimieren (Kuo and Hsueh, 1997; Leung et al., 1995). Inwiefern sich die bei den Mäusen auftretenden Tumore auch molekularbiologisch dieser Entität zuordnen lassen, wird durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass ein konstitutives CD40 in der Lage ist, Lymphome zu induzieren. Die Entstehung von Lymphomen nach B-Zell-spezifischer LMP1 Expression (Kulwichit et al., 1998) kann somit bereits durch das von LMP1 ausgehende CD40-artige Signal erzeugt werden, und muss nicht auf ein qualitativ andersartiges Signal der LMP1 Signaldomäne beruhen.

Es bleibt zu klären, ob die beobachteten Signalunterschiede zwischen einem konstitutiven und einem kurzfristigen CD40 Signal an der Entstehung dieser Neoplasien beteiligt sind. Möglicherweise spielt dabei die Aktivität des nicht-kanonische-NF $\kappa$ B-Signalwegs eine wichtige Rolle. Diese Frage könnte durch eine Kombination des LMP1/CD40-Transgens mit transgenen Mäusen die einen Defekt im nicht-kanonischen Signalweg aufweisen, überprüft werden.

Die Beobachtung, dass ein konstitutives CD40-Signal Lymphome induzieren kann, ist nicht nur im Bezug auf die EBV-Pathogenese wichtig, sondern spielt auch für die Risiken einer möglichen Behandlung von Hyper-IgM-Patienten eine Rolle. Es gibt mittlerweile verschiedene Ansätze der Behandlung dieser Patienten, in denen versucht wird, den CD40-Rezeptor oder dessen Liganden mittels Gentherapie zu ersetzen (Cron, 2003). Auch gibt es Ansätze für Therapien, bei denen die körpereigene Tumorerkennung durch Stimulation mit Zellen gefördert werden soll, die CD40L und Tumor assoziierte Antigene exprimieren (Cormary et al., 2005). Es ist daher wichtig, die möglichen tumorigenen Eigenschaften eines konstitutiv aktiven CD40 zu untersuchen, um eine Induktion von Lymphomerkrankungen durch solche Therapien zu vermeiden.

#### **4.6 Die B-Zellentwicklung in Mäusen wird durch die Expression von EBNA2 nicht beeinflusst**

Bereits vor 30 Jahren wurde entdeckt, dass EBNA2 für die Immortalisierung von B-Zellen durch EBV essenziell ist (Hinuma et al., 1967; Miller et al., 1974). EBNA2 ist für die transkriptionelle Aktivierung einer Reihe von viralen und zellulären Zielgenen verantwortlich. Zu den zellulären Zielgenen gehören z.B. *cd21*, *cd23* und *igm* (Jochner et al., 1996; Knutson,



1990; Wang et al., 1987). Auch das Proto-Onkogen *c-myc* wird durch EBNA2 transkriptionell aktiviert (Kaiser et al., 1999). Die Beobachtung, dass EBNA2 in verschiedenen EBV-assoziierten malignen Erkrankungen von immunsupprimierten Patienten exprimiert wird, führte zu der Frage, ob bei der Immortalisierung von B-Zellen durch EBV, EBNA2 nur die Aktivierung der viralen Gene übernimmt oder auch selber durch die Aktivierung der zellulären Gene Einfluss auf diesen Prozess nimmt. Gegen einen direkten transformierenden Effekt von EBNA2 spricht, dass die B-Zellen von IM-Patienten, die nur EBNA2 exprimieren, klein und ruhend aussehen, im Gegensatz zu den aktivierten Zellen die EBNA2 in Kombination mit LMP1 exprimieren (Niedobitek et al., 1997). Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Expression von EBNA2 in Nierenzellen der Maus zur Bildung von Nierentumoren führt (Tornell et al., 1996).

Bisher konnte der alleinige Einfluss von EBNA2 auf B-Zellen nicht überprüft werden, da EBNA2 immer nur in bereits transformierten Zellen oder im Zusammenspiel mit anderen viralen Genen untersucht wurde. Von seinem zellulären Homolog Notch2, welches ebenfalls über RBP-J $\kappa$  an die Promotoren seiner Zielgene bindet und in B-Zellen exprimiert wird, ist bekannt, dass es für die Entwicklung der Marginal-Zonen-B-Zellen essentiell ist (Saito et al., 2003). Um zu überprüfen, ob und welchen Einfluss EBNA2 auf die B-Zellentwicklung hat, wurde der Mausstamm EBNA2<sup>flSTOPP</sup> generiert und EBNA2 durch die Verpaarung mit CD19cre- und CD21cre-Mäusen B-Zell spezifisch exprimiert. Die hier vorgestellten Analysen waren dabei bislang auf die mit CD19cre gepaarten Mäusen fokussiert. Die Expression von EBNA2 konnte in diesen Mäusen im Western-Blot mit einem gegen den Carboxyterminus des Proteins gerichteten Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.4.1-2). Trotz der nachgewiesenen Proteinexpression konnte in den bisherigen Analysen keine signifikante Veränderung des Phänotyps dieser Mäuse beobachtet werden. Weder die B-Zellpopulationen des Knochenmarks noch die der Milz oder der Lymphknoten waren verändert (siehe Abschnitt 3.4.4). Da für die Differenzierung von MZB-Zellen ein Notch2-Signal benötigt wird, wurde vermutet, dass der Anteil der MZB-Zellen in EBNA2-Mäusen verändert sein könnte. Die B-Zell-spezifische Expression von EBNA2 führt jedoch zu keiner starken Veränderung des MZB-Zell-Anteils. Ob EBNA2-exprimierende Mäuse eine funktionale Immunantwort zeigen, soll durch die T-Zell-abhängige Immunisierung demnächst überprüft werden.

Da verschiedene Onkogene erst in der Kombination mit weiteren transformierenden Ereignissen wirklich zur Transformation von Zellen führen, bleibt abzuwarten, ob ältere EBNA2-exprimierende Mäuse vermehrt Lymphome bilden. Die bisherigen Ergebnisse euten

jedoch an, dass EBNA2 bei der B-Zell-Immortalisierung vor allem eine Funktion in der Regulation der viralen Zielgene hat, und die transformierenden Eigenschaften durch Proteine wie LMP1 vermittelt werden.

Es bleibt zu klären, weshalb in EBNA2-exprimierenden Mäusen keine Regulation der in lymphoblastoiden Zelllinien beschriebenen zellulären Zielgene CD21, CD23 oder Igu nachzuweisen war. Da EBNA2 in lymphoblastoiden Zelllinien jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach stärker exprimiert wird als in den hier beschriebenen Mäusen, besteht die Möglichkeit, dass das Transgen in diesen Mäusen zu schwach exprimiert wird, um diese zu regulieren. Um eine stärkere Expression von EBNA2 zu erreichen, werden die EBNA2-Mäuse momentan auf Homozygotie des Transgens gezüchtet.

Es wäre auch denkbar, dass EBNA2 in der Maus verschiedene Interaktionspartner nicht zur Verfügung stehen, mit denen es in menschlichen Zellen interagiert. Da jedoch EBNA2 genau wie ein aktivierter Notch-Rezeptor in Vorläuferzellen von Maus-Myoblasten die Differenzierung verhindern kann, (Sakai et al., 1998) und die Expression von EBNA2 in Nierenzellen von Mäusen zu Nierenkarzinomen führt (Tornell et al., 1996), ist davon auszugehen, dass die in humanen Zellsystemen beschriebenen Funktionen von EBNA2 auch in der Maus aktiv sind. Um dieser Frage nachzugehen, sollen EBNA2-Mäuse mit Notch2-defizienten Mäusen gekreuzt werden. Sollte EBNA2 in der Lage sein, Notch2 bei der Bildung von MZB-Zellen zu ersetzen, wäre seine Funktionalität bewiesen. Auch sollte beachtet werden, dass es in der Zelle möglicherweise zu einer Konkurrenz zwischen EBNA2 und Notch um die Bindung der Interaktionspartner kommen kann. Sollte dies der Fall sein, ist möglicherweise in den Notch-defizienten Mäusen mit einem Effekt der EBNA2 Expression zu rechnen.

Insgesamt zeigt die hier vorgestellte Arbeit, dass das Epstein-Barr-Virus über LMP1 durch die Imitation eines aktiven CD40-Rezeptors, zur Proliferation und indirekt auch zur Transformation von B-Zellen *in vivo* führen kann. Die hier vorliegenden Ergebnisse der EBNA2-exprimierende Mäuse deuten an, dass EBNA2, bei diesem Prozess hauptsächlich für die Regulation der viralen Gene verantwortlich ist und keinen direkten Einfluss auf zelluläre Gene in B-Zellen hat.

## 5 Zusammenfassung

Die Epstein-Barr-Virus vermittelte Immortalisierung von B-Zellen wird durch die viralen Proteine LMP1 und EBNA2 gesteuert. Beide Proteine immitieren, die Signale von zellulären Faktoren, die bei der B-Zell-Differenzierung eine wichtige Rolle spielen. Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, den Einfluss eines konstitutiv aktiven CD40 auf die B-Zellentwicklung zu untersuchen, um zu zeigen, in wieweit LMP1 durch die Nachahmung eines konstitutiven CD40-Signals B-Zellen in deren Entwicklung beeinflussen oder sogar transformieren kann. Dazu wurden transgene Mäuse generiert, die ein Fusionsprotein, bestehend aus der Transmembrandomäne von LMP1 und der Signaldomäne von CD40, B-zellspezifisch exprimierten. Dieses LMP1/CD40-Fusionsprotein erzeugt Liganden-unabhängig ein konstitutiv aktives CD40-Signal. Die LMP1/CD40-exprimierenden Mäuse entwickelten eine ausgeprägte Splenomegalie, die mit einer starken Zunahme der Anzahl von follikulären und Marginalzonen B-Zellen einherging. Im Gegensatz dazu, war die Anzahl der B1-Zellen in der Peritonealhöhle reduziert. Die B-Zellen in der Milz und in den Lymphknoten zeigten einen aktivierten Phänotyp, wie durch die Zellgröße und die verstärkte Expression von Aktivierungsmarkern nachgewiesen werden konnte. Außerdem proliferierten die ex vivo isolierten LMP1/CD40-exprimierenden B-Zellen spontan und überlebten länger als Wildtypzellen in Kultur. Die Aktivierung der Zellen war erstaunlicherweise nicht von einer verstärkten Aktivität des kanonischen NF $\kappa$ B-Signalweges begleitet, wie es bei einer CD40-Aktivierung von Wildtyp B-Zellen der Fall ist, sondern von einer schwachen Aktivierung des nicht-kanonischen NF $\kappa$ B-Signalweges, was auf einen qualitativen Unterschied zwischen dem konstitutiven und dem Liganden-aktivierten CD40 Signal hinweist.

Wie für LMP1 bereits beschrieben, hemmte auch LMP1/CD40 die Keimzentrumsbildung nach Immunisierung mit T-Zell-abhängigen Antigenen. Dies zeigt, dass nicht die Signaldomäne, sondern die konstitutive Aktivität von LMP1 für die Hemmung der Keimzentrumsreaktion verantwortlich ist. Daraus lässt sich schließen, dass falls eine EBV-infizierte Zelle ins Keimzentrum eintritt, zeitweilig keine LMP1-Signale vorhanden sein dürfen. Des Weiteren zeigte sich, dass im Gegensatz zu LMP1 die LMP1/CD40-Expression nicht nur zu einer Reduktion der hochaffinen- sondern auch der niederaffinen-Antikörper nach T-Zell-abhängiger-Immunisierung führte. Auch war LMP1/CD40 nicht in der Lage, wie LMP1 den extrafollikulären Klassenwechsel in CD40-defizienten Mäusen zu rekonstituieren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die LMP1-Signaldomäne zusätzliche Eigenschaften besitzt, die der CD40-Signaldomäne fehlen.

Im Alter zwischen 12 und 18 Monaten entwickelten 31% der LMP1/CD40-exprimierenden Mäuse follikuläre Lymphome, die morphologisch denen beim Menschen auftretenden follikulären Lymphomen stark ähneln. Damit haben LMP1/CD40-exprimierende Mäuse eine ähnliche Tumorzinzidenz wie LMP1-exprimierende Mäuse. Diese Daten zeigen zum ersten Mal, dass ein konstitutives CD40-Signal Lymphoproliferation induziert und letztendlich zur Entstehung von Lymphomen führen kann. Für LMP1 lässt sich daraus schließen, dass es bereits durch die Nachahmung eines konstitutiv aktiven CD40 Rezeptors transformierende Eigenschaften hat.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Frage, ob EBNA2 als virales Pendant zu einem aktivierten Notch-Rezeptor direkten Einfluss auf die B-Zell Entwicklung hat. Zu diesem Zweck wurden transgene Mäuse generiert, in denen die EBNA2-Expression B-zellspezifisch aktiviert werden kann. Obwohl es möglich war, die Expression des Proteins in den B-Zellen der Maus nachzuweisen, wurde bei diesen bislang keine Veränderung des B-Zell-Phänotyps beobachtet. Dies könnte andeuten, dass EBNA2 bei der Transformation von B-Zellen im viralen Kontext in erster Linie der Regulation der viralen Proteine dient. Es bleibt jedoch abzuwarten, ob EBNA2-exprimierende Mäuse in höherem Alter vermehrt maligne Erkrankungen zeigen.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Reagenzien

Amersham Biosciences Freiburg	Hyperfilm-ECL; ECL-Western Blotting Reagenz; "Ready-to-go DNA labelling beads"; Hybond-N-Zellulosemembran; Hybond-P-Nitrocellulose Membran; $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000Ci/mmol),
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	70 $\mu\text{m}$ „Zell-Strainer“; FACS Antikörper; ELISA Antikörper; FACS-Calibur
BioRad, Hercules, USA	Western-Blot-Aparatur; PCR-Maschine; Elektrophoresekammer
Biozol, Eching	Agonistische $\alpha$ -CD40-Antikörper (Klon 1C10)
Biosearch Technologies, Novato-CA USA:	NP-CGG (Chicken Gamma Globulin)
Biochrom KG, Berlin	Fötales Kälberserum (FKS)
Branson	Sonifier 250
Corning-Schiphol-Rijk Niederlande	Reagent Reservoir 50ml aus Polysterene; PCR-Tubes;
Difco Laboatories Detroid, Michigan, USA	Bacto-Agar; Hefeextract; Trypton
Diagnostic chemicals limited PEI USA	Dithiothreitol (DTT)
Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA	Biomax MS Filme
Eppendorf Gerätebau Hamburg	Tischzentrifuge 5415, Reaktionsgefäße in verschiedenen Größen, BioPhotometer
Eppendorf, Köln	Taq-DNA-Polymerase; dNTP-Nukleotide Thermomixer compact; Taq DNA Polymerase; dNTP Set; Photometer; Eppendorftischzentrifuge
Genomed, Bad Oeynhausen	Maxi-Präparations-Kit für Plasmidpräparationen (Jetstar)
Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein	Fötales Kälberserum (Feeder-Zellkultur, Mauspräparationen); L-Glutamin für Zellkultur; Natrium-Pyruvat für Zellkultur; Penicillin/Streptomycin; Trypsin-EDTA (1x); Trypanblau; Zellkulturmedien; RPMI 1640, DMEM; Yeast Extract; Bacto-Agar; Bacto-Trypton; Trypanblau
Hereus Christ Instruments, Düsseldorf	Zytoperm-Begasungs-Brutschrank; Umluft-Sterilbank; Zentrifuge
Invitrogen Life Technologies USA	1kb DNA-Ladder; Pre-Stained Protein Ladder; Agarose
ICN Biomedicals USA	Bovines Serumalbumin (BSA)

Kodak, USA	Entwicklermaschine X-OMAT
Linaris Wertheim-Bettingen	Avidin/Biotin Blocking Kit
MBI Fermentas St.Leo-Rot	Restriktionsendonukleasen
Metabion Martinsried	Oligonukleotide
Miltenyi-Biotec	CD43 und CD19-Beads; LS-Columns; LD-Columns
New England BioLabs Frankfurt	T4 Ligase DNA-Ligase; Restriktionsendonukleasen;
New Brunswick Scientific, Edison, USA	Bakterienschüttler
Nunc GmbH, Wiesbaden	Cryotubes; Zellkulturschalen; Zellkulturflaschen Immunoplatten I96F Maxi –SORB für ELISA
Oxoid, Wesel	Defibriniertes Schafblut
Promega	Maus-IL4
PAN	Fötales Kälberserum (ES-Zellkultur)
Quiagen, Hilden	Maxi DNAeasy Kit für DNA Präparation
Roche	Alkalische Phosphatase; Polyd(I-C); Ampicillin; Proteaseinhibitor
Roth Karlsruhe	Phenol, Acrylamid
SAKURA	O.C.T. Tissue-Tek
Science Services-München	Einbettformen
Sigma, St Louis USA	Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP); Lipopolysaccharid E.coli 055:B5 Purified by trichloacetic acid extraction; Ethidiumbromid
Schubert & Weiss	Neubauer-Zählkammer
Stratagene, La Jolla, USA:	PFU-DNA-Polymerase
VMR International:	Albumin Fraktion V; Spritze
Zeiss <u>Jena</u>	Mikroskop; Binokular

Alle hier nicht aufgeführten Materialien werden im Methodenteil erwähnt oder wurden von Sigma Chemie (München), Merck-Eurolab GmbH (Darmstadt), Greiner (Frickenhäusen) oder Falcon (über BD-Bioscience, Franklinlakes, NJ USA) bezogen.

### 6.1.2 Plasmide

#### **pSG5-LMP1/CD40 (Ursula Strobl, Institut für klinische Molekularbiologie München)**

Dieses Plasmid enthält die cDNA für das Fusionsprotein LMP1/CD40 unter der Kontrolle des SV40 Promotors/Enhancers. Am Anfang des dritten Exons von *lmp1*, 68 bp vor der NcoI-Schnittstelle, wurde die Sequenz für ein „HA-Tag“ kloniert, um das Protein besser detektieren zu können. Hinter dem Gen ist eine Polyadenylierungs-Sequenz kloniert. Das Plasmid wurde als Quelle für die Klonierung des *lmp1/cd40* Targeting-Vektors verwendet und als positive Kontrolle für die Western-Blot-Analysen in 293 Zellen transient transfiziert.

#### **pRosa26-5-pBS KS (Phillipe Soriano, Seattle)**

pBSIIKS-Klonierungs-Plasmid mit einem 550bp langen Fragment aus dem ersten Intron des Rosa26-Lokus, welches von einer *EcoRI*- und einer *PacI*-Schnittstelle flankiert ist. Das so gewonnene Fragment kann als Southern-Blot-Sonde verwendet werden.

#### **pGK-cre-bpA (Kurt Fellenberg, Institut für Genetik, Köln)**

Dieses Plasmid trägt das Gen für die Rekombinase Cre, welches unter der Kontrolle des Promotors des Haushaltsgens „Phosphoglyceratkinase“ (PGK) steht. Hinter dem Cre-Rekombinase-Gen befindet sich eine Polyadenylierungssignalsequenz (bpA), die für die richtige Expression des Gens notwendig ist.

### **II Ga986/20**

Dieses Plasmid trägt die EBNA2 kodierende Sequenz des EBV Klons „MABA“, die für die Generierung der EBNA2-transgenen Maus verwendet wurde.

#### **pTVRosa26 LMP1**

Bluescript-Vektor mit dem vom Epstein-Barr-Virus kodierten latenten Membranprotein 1 (LMP1), das in eine Targetingkassette integriert ist, die es ermöglicht, das Transgen über einen 1kb und einen 4kb langen dem *rosa26*-Lokus homologen Bereich in den *rosa26*-Lokus zu integrieren (Ausgangsplasmid: pRosa26-1: Phillipe Soriano, Seattle). Vor dem Transgen ist eine mit loxP Sequenzen flankierte Stopp-Kassette integriert, die die FRT-Sequenz flankierte Sequenz des „rot fluoreszierenden Proteins“ (RFP) kodiert. Darauf folgt das *neomycin* Gen und im Anschluss eine Stopp-Sequenz, die eine Polyadenylierungs-Sequenz mit Stopp-Kodons in allen drei Leserahmen trägt. Der Vektor trägt außerhalb der

Targetingkassette das Gen des Selektionsmarkers Diphtheriatoxin (DTA), dessen Transkription von einem pGK Promotor gesteuert wird. (Sequenz siehe Appendix1)

### **6.1.3 Sonden für Southern-Blot-Analysen**

#### **Rosa26-Sonde**

Die 550 bp Sonde wurde aus dem Plasmid pRosa26-5-pBS KS mit den Enzymen *EcoRI* und *PacI* isoliert. Waschbedingungen: Membran nach Hybridisierung 30 Min. bei 65 °C in 1xSSC 0,1 % SDS waschen.

#### **Neo-Sonde**

Der Sonde wurde das Neoresistenz-Gen (*neo<sup>r</sup>*-Gen) mit *EcoRI* und *XbaI* aus dem pEasy-Flox geschnitten und mit diesen Schnittstellen in PBIKS inseriert. Anschließend wurde die Sonde (466 bp) mit *RsrII* und *PstI* aus dem Plasmid präpariert. Waschbedingungen: Die Membran wurde für 10 Minuten in 1x SSC 0,1 % SDS bei 65 °C gewaschen.

#### **EBNA2 Sonde**

Die EBNA2 Sonde wurde aus dem Vektor CD27.8 isoliert, mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BamHI* und *NcoI* geschnitten und das 619 bp Große Fragment isoliert. Der Vektor trägt die *ebna2* Sequenz, die in einen Bluescript Vektor kloniert wurde. Waschbedingungen: Membran nach Hybridisierung 30 Min. bei 65 °C in 1xSSC 0,1%SDS gewaschen

#### **IgH Sonde (Gao et al., 2000)**

Bei der IgH Sonde handelt es sich um eine Sequenz die zwischen den J4- und Eμ-Segmenten des IgH Locus sitzt und mit den Enzymen *NaeI* und *EcoRI* aus diesem isoliert wurde. Das Fragment ist in einen Bluescript-Vektor kloniert und kann mit den Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* aus dem Plasmid geschnitten werden. Waschbedingungen: Membran nach Hybridisierung ca.15 Min. bei 60 °C mit 2xSSC, 0,1 % SDS waschen.

### **6.1.4 Bakterien**

#### **XL-1blue: *Escherichia coli*-Stamm**

Genotyp: F<sup>+</sup>:Tu10 proA+B+ lacIq D (lacZ) M15/recA1 end A1 gyr A96 (Nal<sup>r</sup>) thi hsd R17 (rk-mk+) glu V44 rel A1 lac. Der Originalbakterienstamm wurde von der Firma Stratagene bezogen, und von G. Laux zur Verfügung gestellt.



## **DH5 $\alpha$**

*Escherichia coli*-Stamm;

Genotyp: F<sup>-</sup>,  $\phi$ dlacZ  $\Delta$  M15, endA1, recA1, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>-</sup>), supE44, thi-1, gyrA96, relA1,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169,  $\lambda$ <sup>-</sup>

### **6.1.5 Zelllinien**

**Balb/C embryonale Stammzellen (ES)** (B. Ledermann und K. Bürki, Basel)

ES-Zelllinie aus Mausblastozysten des Stammes Balb/C J. wurden für die Generierung des Mausstammes LMP1/CD40<sup>flSTOP</sup> verwendet.

**Bruce4 embryonale Stammzellen (ES)** (Klaus Rajewsky, Genetik Köln-NCBI Boston)

ES-Zelllinie aus Mausblastozysten des Stammes C57/BL6. wurden für die Generierung des Mausstammes EBNA2<sup>flSTOP</sup> verwendet.

**293-Zellen** (Graham et. al., 1977) von Ursula Strobl, GSF München zur Verfügung gestellt.

Transformierte fibroblasten ähnliche Zell-Linie wurde aus embryonalen Nierenzellen gewonnen. In dieser Arbeit wurde sie für die Herstellung der Positivkontrolle für den Western-Blot transient mit den Plasmiden pSG5-LMP1/CD40 transfiziert.

**Raji** (Pulvertaft et. al., 1964) von Georg Bornkamm, GSF München zur Verfügung gestellt.

EBV-positive Burkitt-Lymphom Zelllinie.

**Embryonale Fibroblasten (EF-Zellen)**

Wurden aus Mäusen des Maustammes DR-4 (Tucker et al., 1997) von Frau Angela Egert (Institut für Genetik Köln) präpariert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

### **6.1.6 Mausstämme**

**C 57BL/6** (Charles River, WIGA, Sulzfeld)

Wurden zur Verpaarung der EBNA2 transgenen verwendet um ein Wildtyp Allel zu halten.

**Balb/C J** (GBF/Braunschweig)

Mäuse dieses Stammes wurden zur Zucht der Ammenmütter verwendet.

Außerdem wurden die erzeugten Chimären mit diesem Inzuchtstamm gekreuzt, um diese auf Keimbahntransmission zu überprüfen und einen stabilen Stamm zu etablieren.

**C57BL/6 X Balb/C**

Aus der Kreuzung dieser Stämme wurden die Weibchen für den Blastozystentransfer gewonnen, sowie die vasktomierten Männchen, die zur Erzeugung der Scheinschwangerschaft bei den Weibchen benötigt wurden.

**DR-4 (Tucker et al., 1997)**

Dieser Stamm wurde zur späteren Gewinnung von Fibroblasten mit C57BL/6 Mäusen gekreuzt.

**CD19cre (R.C.Rickert, Institut für Genetik, Köln (Rickert et al., 1997))**

C57BL/6 Stamm mit einer Integration des Gens für die Cre Rekombinase in den CD19 Lokus.

**CD21cre (M. Kraus, Instiut für Genetik, Köln (Kraus et al., 2004))**

C57BL/6 Stamm mit einer Integration des Gens für die Cre Rekombinase, das von dessen Expression von einem künstlich inserierten CD21 Promotor gesteuert wird. EDV

Folgende Programme wurden zum Erstellen dieser Arbeit verwendet:

**6.1.7 EDV**

Folgend eProgramme wurden zum Erstellen dieser Arbeit verwendet:

Microsoft Exel 2000	Tabellen und Kalkulationen	CELLQuest Becton Dickinson	FACS Aufnahmen und Auswertung
Microsoft Word XP	Textverarbeitung	Internet Explorer	Literaturarbeit
Clone Manager 6	Sequenzverarbeitung	Microsoft Powerpoint	Bildbearbeitung
Adope Photoshoph	Bildbearbeitung	OpenLab Improvision	Digitalaufnahmen

**6.2 Molekularbiologische Methoden****6.2.1 DNA-präparative Techniken****6.2.1.1 DNA-Isolation****DNA-Präparation von ES-Zellen in 96-Loch-Platten**

Für die Präparation der ES-Zell-Klone aus 96-Loch-Platten wurden diese bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und je Loch 50 µl Lyse-Puffer (10 mM Tris pH7,5 , 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5 % Sarcosyl, 1 mg/ml Proteinase

K) zugegeben. Die Platten wurden dann in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 56 °C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag bei Raumtemperatur für 30 Minuten abgekühlt. Anschließend wurden 100 µl 100 %-Ethanol je Loch zugesetzt, um die DNA zu präzipitieren. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wurde die DNA durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Die DNA wurde dann noch zweimal mit 100 µl 75 %-Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und direkt in (35 µl/Loch) der vorbereiteten Lösung für den darauf folgenden Restriktionsverdau resuspendiert.

### **DNA-Präparation von ES-Zellen aus 10 cm-Platten**

Zur Präparation der genomischen DNA von ES-Zellklonen in größeren Mengen wurden die Klone auf 10-cm-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in Lysepuffer (siehe 2.1.1.1) aufgenommen. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden dann die sich von der Unterlage lösenden Zellen mit einer Pipette in Falcon-Röhrchen überführt und bei 56 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die DNA über eine Ethanol-Präzipitation (siehe 1.2.1.2) isoliert. Statt der Zentrifugationsschritte wurde die DNA jedoch mittels eines Glashakens aus der Lösungen geholt und bei jedem Schritt in ein neues Gefäß überführt.

### **DNA Isolation aus Mausschwanzzellen**

Es handelt sich um ein leicht abgewandeltes Verfahren von Laird (Laird et al., 1991). Den Mäusen wurde ein etwa 0,3 cm langes Stück des Schwanzes abgeschnitten und über Nacht in 500 µl Lysepuffer (Tris/HCl pH 8, (100 mM); EDTA (5 mM); SDS (0,2 %); NaCl (200 mM); 100µg/ml Proteinase K) bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden Knochen und Haare durch 5 minütiges Zentrifugieren bei 10000 x g sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Zur Proteinfällung wurde 1/3 5M NaCl-Lösung zugegeben und nach erneuter 10 minütiger Zentrifugation bei 10000 x g der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Dem Ansatz wurde dann 1 ml 100 % Ethanol für die DNA-Präzipitation zugesetzt und wie oben erneut zentrifugiert. Danach wurde noch einmal mit 70 % Ethanol gewaschen und wie vorher beschrieben zentrifugiert. Danach wurde die DNA getrocknet und anschließend in 100 µl Tris/HCl aufgenommen und gelöst indem sie für mehrere Stunden bei 37°C geschüttelt wurde.

### **Isolation genomischer DNA für Southern-Blot-Analysen**

Um eine möglichst reine DNA für Southern-Blot-Analysen zu erhalten, wurde die DNA aus  $5 \times 10^6$  Zellen mit Hilfe des Qiagen DNA Maxi Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Die DNA wurde anschließend gefällt und in 50 µl TE aufgenommen.

### **Isolation von Plasmiden aus Bakterien**

Plasmid DNA wurde für die Klonierung mit dem Jetstar Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Für die Transfektion wurden die Plasmide mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

## **6.2.1.2 DNA Fällung und Reinigung**

### **Ethanol Präzipitation der DNA**

Der gelösten DNA wurde zunächst 1/10-Volumen 3 M NaAc und 2 ½ Volumen 100 % EtOH zugesetzt. Danach wurde die Probe für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit  $9000 \times g$  für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgegossen und die DNA mit 3 Volumen 70% EtOH gewaschen. Nach 10 Minuten Inkubation bei RT wurde dann wiederum bei  $9000 \times g$  zentrifugiert, getrocknet und anschließend in H<sub>2</sub>O oder in 10 mM Tris-Puffer (HCl) pH 7 aufgenommen.

### **Phenol Extraktion von DNA:**

Mit dieser Methode können Proteinkontaminationen in der DNA-Lösung beseitigt werden. Die DNA-Lösung wurde auf ein Minimalvolumen von 200 µl gebracht und anschließend mit Volumen TE-gesättigtem Phenol (pH 8,0) versetzt. Nach dem Vermischen der Lösungen durch zweiminütiges starkes Schütteln wurde die Phasentrennung durch Zentrifugation bei  $9000 \times g$  für zwei Minuten erzielt. Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform versetzt. Durch zweiminütiges starkes Schütteln wurden die Lösungen vermischt und wiederum wie oben zentrifugiert. Die DNA, in der oberen wässrigen Phase, wurde anschließend durch Ethanol-Präzipitation gefällt.

## **6.2.2 Techniken der DNA-Analyse**

### **6.2.2.1 Enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA**

Die Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen wurde unter den vom Hersteller vorgeschlagenen Bedingungen und Puffern durchgeführt.

#### **6.2.2.2 Enzymatische Spaltung genomischer DNA aus ES-Zellen:**

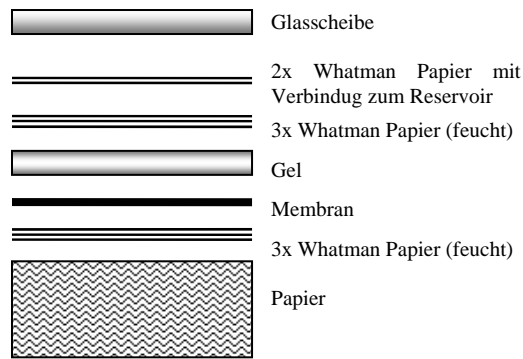
Bei der Spaltung von genomischer DNA aus Zellen, die direkt in 96-Loch-Platten präpariert wurden, wurde die DNA direkt nach der Fällung in 35 µl Restriktionslösung (Spermidin 1 mM, DTT 1 mM, BSA 100 µg/ml, RNase 50 µg/ml, Puffer (10X) 1/10 Volumen, Enzym 50 U/Loch) aufgenommen und die Platten, nach der Versiegelung mit Parafilm, in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für die Spaltung genomischer DNA, die bereits gelöst war, wurden 5-10 µg DNA mit 50-60 µl Restriktionslösung bei 37 °C über Nacht inkubiert.

#### **6.2.2.3 Southern-Blot nach Southern, E.M.**

Durch die von Southern entwickelte Methode ist es möglich, die in einem Agarosegel durch elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennte DNA auf eine Membran zu transferieren. Durch das anschließende Hybridisieren der fixierten DNA auf der Membran mit einer radioaktiv markierten Sonde ist es möglich, spezifische DNA-Fragmente als Banden auf der Membran zu detektieren. Dabei ist die Spezifität des Nachweises von der Spezifität der Sonde abhängig, die einem Teil der nachzuweisenden Region komplementär ist.

Die mit Restriktionsenzymen verdaute DNA wurde nach Zugabe von 1/10 Ladepuffer auf ein 0,8-1 % Agarosegel (Ethidiumbromid 5µg/ml) aufgetragen. Um später die Größe der detektierten Fragmente bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Größenstandard auf das Gel aufgetragen (7,5 ng 1 kb DNA-Leiter). Nach der Auftrennung der DNA im Gel durch Gelelektrophorese (Sambrook et al., 2001), wurde dieses zusammen mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert. Anschließend wurde das Gel für 20 Minuten in 0,25 N HCl auf dem Schüttler geschwenkt. Danach wurde es kurz mit Wasser gewaschen und 40 Minuten in dem alkalischen Transferpuffer (0,4 M NaOH; 0,6 M NaCl) inkubiert. Anschließend wurde die Blot, wie in Abb. 1.7 zu sehen, aufgebaut. Nach 4-16 Stunden wurde der Blot abgebaut, die Position der Geltaschen markiert und die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt. Danach wurde die DNA 2 h bei 80 °C gebacken auf dieser fixiert. Danach konnte der Blot für die Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde vorbereitet werden.



### Abbildung.7.1 Aufbau Southern-Blot:

Auf einen Stapel mit Papiertüchern wurden zwei trockene 3MM-Papiere gelegt, danach ein weiteres in Transferpuffer getränktes und anschließend die ebenfalls in Puffer angefeuchtete Nylon-Membran Hybond-N (Amersham Bioscience, Freiburg). Anschließend wurde das Gel auf die Membran gelegt und mit drei weiteren angefeuchteten 3MM-Papieren zugedeckt. Zum Schluss wurde die Verbindung zum Transferpuffer-Reservoir über zwei lange angefeuchtete 3MM-Papiere hergestellt und der ganze Aufbau mit einer Glasscheibe abgedeckt.

### Hybridisierung der Southern-Blot Membran

Zum Blocken unspezifischer Bindungen wurden die Membranen prähybridisiert. Der Blot wurde dazu in 2XSSC (0,3 M Na Cl; 0,03 M NaCitrat) angefeuchtet und in einem Glaszylinder in vorgewärmter Hybridisierungslösung (1 M NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 10 % Dextransulfat, 1 % SDS, 250 µg/ml sonifizierte Lachssperma DNA) für mindestens 3 Std. bei 64 °C im Hybridisierungssofen, inkubiert.

### Markierung der Sonde

Es wurden jeweils 50-100 ng Sonden-DNA mit 50µCi α32-dATP mit Hilfe des „Random Prime Labeling Kit“ (Amersham Bioscience; Freiburg) nach Firmenprotokoll markiert. Anschließend wurde die markierte Sonde mit Hilfe einer G50 Sephadex Säule (Amersham Bioscience; Freiburg) nach Firmenprotokoll gereinigt. Danach wurde die Probe durch fünfminütige Inkubation bei 100 °C denaturiert und der Hybridisierungslösung beigemischt. Die Membran wurde anschließend 16 Std. bei 65 °C im Hybridisierungssofen inkubiert und anschließend mit vorgewärmtem Waschpuffer bei 56 °C -60 °C gewaschen. Die Waschbedingungen wurden je nach Sonde variiert und sind daher bei der Beschreibung der Sonden einzeln vermerkt. Die markierten Banden auf der Membran ließen sich im Anschluss mit einem fotosensitiven Film (Biomax MS PE Applied Biosystems 35x43 cm, KODAK Film) nachweisen. Die radioaktive Sonde konnte bis zu zwei Wochen aufgehoben und nach zehnminütigem Aufkochen wieder verwendet werden.

### Entfernen einer Sonde

Es ist möglich, eine Membran mit verschiedenen Sonden zu hybridisieren. Zur Vermeidung von überlappenden Signalen wurde die alte noch an die Membran gebundene Sonde abgewaschen. Dazu wurde der Blot in ca. 20 Min. 95 °C heiße, 0,1 % SDS Lösung gegeben und langsam auf 51 °C abgekühlt. Mit Hilfe des Phosphoimagers (Fuji Bas 1000, Japan)

wurde untersucht, wie gut die alte Sonde entfernt wurde. Anschließend konnte die Membran wie üblich für die Hybridisierung verwendet werden.

#### 6.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1985; 1988)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von DANN-Fragmenten aus ES-Zellen verwendet, um die Sequenz des integrierten Targetingvektors vor der Generierung der transgenen Mäuse durch Sequenzierung der amplifizierten DNA zu überprüfen. Diese Technik wurde außerdem für die Genotypisierung der transgenen Mäuse verwendet. Hierzu wurde genomische DNA verwendet, die aus Schwanzzellen der Mäuse isoliert wurden. Die Magnesium-Konzentration der Reaktionsansätze sowie das PCR-Programm wurden je nach Primerpaar gewählt.

##### Reaktionsansatz:

DNA	ca.5-10 ng
Primer (50 µM)	1 µl
dNTP-Mix (2 mM)	10 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2-3 µl
DMSO (100 %)	0,5 µl
Taq-Polymerase (5 U)	0,5 µl
Puffer (10 X)	5 µl
Wasser	auf 50 µl auffüllen

##### Reaktions-Zyklus:

Starttemperatur:	94 °C	2 Min.. 30 sec.
Zyklische Denaturierung:	95 °C	45 sec.
Hybridisierung:	56-58 °C	45 sec.
Verlängerung:	72 °C	45 sec.-1½ Min.
Finale Verlängerung:	72 °C	7-10 Min.
Anzahl der Zyklen:	28-31	

Primer Name:	Primer Sequenz
36: neo fw1	CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC
37: neo rev	AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC
38: CD40wt rev1	GAG ATG AGA AGG AAG AAT GGG AAA AC
39: CD40wt fw1	GGC AGT AAG ACG ATG TGA CAA CAG AG
60: Rosa fw1	CTC TCC CAA AGT CGC TCT G
61: RFP fw Seq	GGT GCT TCA CGT ACA CCT TGG AGC
62: Rosa rev2	TAC TCC GAG GCG GAT CAC AAG C
Cre7	TCA GCT ACA CCA GAG ACG G
CD19d	CCA GAC TAG ATA CAG ACC AG
CD19c	AAC CAG TCA ACA CCC TTC C
CD21 NDE	TCT GGC ATA CTT ATT CCC TGA AG
CD21 Cre rev	GAA CCT CAT CAC TCG TTG CAT C
Ex1Fw1 LMP1	AGG AGC CCT CCT TGT CCT CTA
CD40 PCR3	CTG AGA TGC GAC TCT CTT TGC CAT

Primerpaare und PCR Bedingungen zum genotypisieren der transgenen Mäuse:

Nachweis:	Primer:	PCR Programm:	MgCl <sub>2</sub>
CD19cre	Cre7, CD19d, CD19c	94°C-5';94°C-45''; 57°C-45''; 72°C-50';72°C-10' Schritte 2-3 30X	2 mM
CD21cre	CD21NDE, CD21cre rev	94°C-5';94°C-45''; 61°C-45''; 72°C-1'; 72°C-10' Schritte 2-3 33X	4 mM
LMP1/CD40	Ex1Fw1LMP1, CD40PCR3	94°C-5';94°C-45''; 55°C-45''; 72°C-1'15''; 72°C-10' Schritte 2-3 31X	2 mM
EBNA2	60, 61	94°C-5';94°C-45''; 56°C-45''; 72°C-50'';72°C-10' Schritte 2-3 33X	3 mM
Rosa 26 +/+	60, 62	94°C-5';94°C-45''; 58°C-45''; 72°C-1';72°C-10' Schritte 2-3 33X	3 mM
Rosa 26 +/-	60, 61	94°C-5';94°C-45''; 56°C-45''; 72°C-1';72°C-10' Schritte 2-3 33X	2 mM
CD40wt +/+	38, 39	94°C-5';94°C-45''; 57°C-45''; 72°C-45'';72°C-10' Schritte 2-3 33X	2 mM
CD40 wt +/-	37, 39	94°C-5';94°C-45'';58°C-45''; 72°C-1'; 72°C-10' Schritte 2-3 33X	2 mM

## 6.2.3 Proteintransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen

### 6.2.3.1 Präparation von Proteinen aus Zellen

Für die Isolierung der Zellproteine wurden  $3 \times 10^6$  Zellen bei Zellkultur-Zellen und  $5 \times 10^6$  Zellen bei primären B-Zellen verwendet. Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und anschließend direkt in 60 µl heißem 2x Laemmli Probenpuffer (2,5% SDS, 20% Glycerin, 0,12 M Tris pH 6,8) aufgenommen. Um die Degradation der Proteine durch Proteasen zu minimieren, wurden Protease Inhibitoren zugegeben (Protease Inhibitor Complete Mini Tabletten, Roche). Die Proben wurden 5 Minuten bei 100 °C erhitzt und anschließend gut gemischt. Die Lysate wurden für weitere Experimente verwendet bzw. bei -20°C eingefroren. Proteinextrakte wurden teilweise auch aus eingefrorenen Zellen gewonnen. Diese wurden vor dem Einfrieren einmal mit PBS gewaschen und in ca. 25 µl PBS bei -80 °C gelagert.

### 6.2.3.2 Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung des Proteins erfolgte mit dem DC Protein Assay von Bio-Rad und wurde nach Firmenprotokoll durchgeführt. Zur Ermittlung der Konzentration wurde parallel zu den Proben eine Eichgerade mit Rindergammaglobulin angefertigt.

### 6.2.3.3 SDS-PAA-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Bei dieser Methode wurden die Proteine in einem Polyacrylamidgel (PAA-Gel) aufgetrennt, das 0,1 % SDS enthält. Zur Vorbereitung der Zelllysate, die nach dem Protokoll in 3.6.1 isoliert wurden, wurde zu jeder Probe jeweils 1/10 Volumen 1M DTT und 1/10 Volumen



Bromphenolblau-Lösung gegeben und diese nochmals 5 Minuten bei 100 °C aufgeköcht. Durch das Aufkochen wurden die enthaltenen Proteine denaturiert und die erneute Faltung durch das Detergenz SDS verhindert, welches die Eigenladung der Proteine überlagert, so dass alle Proteine negativ geladen sind. Die Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten wurden durch DTT reduziert.

Das Acrylamidgel bestand aus einem Sammelgel, das der Fokussierung der geladenen Proteine dient und einem Trenngel, das die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse ermöglicht. Die verwendeten 10 % und 12 %-igen Trenngele ermöglichten eine Auftrennung von Proteinen im Bereich zwischen 20 und 80 kDa.

Die vorbereiteten Proben wurden auf das mit 1x Laemmli-Laufpuffer überschichtete Gel aufgetragen. Für den Größenvergleich wurde ein Proteinstandard mitgeführt. Die Elektrophorese wurde in einer Bio-Rad Vorrichtung bei 100 V durchgeführt.

#### **Trenngel 10 %**

4 ml	H <sub>2</sub> O
3,3 ml	30 % Acrylamid (Rotiphorese Gel 30, Roth)
2,5 ml	1,5M Tris pH 8,8
100 µl	10 % SDS
100 µl	10 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)
4 µl	10 % TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin)

#### **Trenngel 12 %**

3,3 ml	H <sub>2</sub> O
4 ml	30 % Acrylamid
2,5 ml	1,5M Tris pH 8,8
100 µl	10 % SDS
100 µl	10 % APS
4 µl	10 % TEMED

#### **Sammelgel**

3,4 ml	H <sub>2</sub> O
40 µl	30 % Acrylamid
625 µl	1M Tris pH 6,8
50 µl	10 % SDS
50 µl	10 % APS
3 µl	10 % TEMED

#### **10x Laemmli Laufpuffer**

30.3 g	TRIS Base
144.2 g	Glycin
10 g	SDS oder 100 ml 10% SDS
auf 1 Liter mit H <sub>2</sub> O auffüllen	

### **6.2.3.4 Western-Blot nach Towbin et al., 1979**

Bei der Western-Blot-Analyse können die im SDS-PAA-Gel aufgetrennten Proteine durch elektrischen Transfer auf eine proteinbindende Nitrozellulosemembran transferiert werden. Da das elektrische Feld dabei senkrecht zur vorherigen Trennrichtung angelegt wird, bleibt das Muster der getrennten Proteine auf der Membran erhalten. Es wurde ein sogenannter „Nass-Blot“ in einem Bio-Rad-Tank durchgeführt, bei dem die gesamte Blotvorrichtung mit Blotpuffer überdeckt ist. Vor dem Blotvorgang wurde die Nitrozellulosemembran (Hybond-P, Amersham) mit Puffer angefeuchtet. Anschließend wurde die Membran in Wasser gewaschen und fünf Minuten in Blotpuffer äquilibriert. Das Acrylamidgel wurde ebenfalls fünf Minuten in Blotpuffer äquilibriert und dann auf drei mit Blotpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Auf das Gel wurde die Nitrozellulosemembran gelegt und auf diese drei weitere in Blotpuffer getränkte Filterpapiere. Anschließend wurde der Blot zwischen Anode und Kathode der

Kammer so angeordnet, dass die negativ geladenen Proteine in Richtung Membran wanderten. Die Transferkammer wurde mit Blotpuffer (3,03 g Tris Base, 14,42 g Glycin, 200 ml Methanol auf 1 Liter mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt, ein Kühlelement hineingestellt und für eine Stunde unter Rühren ein elektrisches Feld von 100 V angelegt. Anschließend wurde die Membran in PBS gewaschen und für fünf Minuten mit Ponceau S (2 % PonceauS, 30 % Trichloressigsäure, 30 % Sulfosalicylsäure) gefärbt, um den Transfer der Proteine zu überprüfen. Für weitere Analysen wurde die Membran in Wasser gewaschen, bis die Ponceau S Färbung entfernt war und feucht bei 4 °C aufbewahrt.

### **6.2.3.5 Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörpern**

Proteine von Interesse können mit spezifischen Antikörpern auf der Western-Blot-Membran nachgewiesen werden. Der Proteinnachweis erfolgt über zwei Antikörper. Der Erstantikörper bindet spezifisch das gesuchte Protein und mit Hilfe des Zweitantikörpers, der den Erstantikörper spezifisch bindet, wird das Protein mittels einer Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Der Zweitantikörper ist an die Meerrettich (horseradish)-Peroxidase (HRP) gekoppelt, die die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazides Luminol katalysiert. Das oxidierte Luminol emittiert Licht, welches durch die Exposition eines lichtsensitiven Filmes (Hyperfilm ECL, Amersham) nachgewiesen werden kann. Die Chemolumineszenz wird verstärkt, indem die Oxidation von Luminol durch HRP in Anwesenheit eines chemischen Verstärkers wie Phenol durchgeführt wird.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Western-Blot Membranen zunächst in einer 5 % Milchpulver-PBS-Lösung für 1 Std. bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde mit dem Erstantikörper, der in einer 1%-Milchpulver-Lösung (+ 0,05 % Azid) verdünnt wurde, über Nacht inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen und dann mit dem Zweitantikörper, der in einer 1 % Milchpulver-PBS-Lösung verdünnt wurde, für 1 bis 3 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran wieder dreimal für 10 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde mit dem ECL-Detektionsreagenz (Amersham) die Chemolumineszenz-Reaktion angeregt. Die Membran wurde auf einen Film aufgelegt und der Film anschließend in einer Kodak-Entwicklungsmaschine entwickelt.

Die für die Immundetektion verwendeten Antikörper und die verwendeten Verdünnungen sind unter 1.1.2 aufgelistet.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
$\alpha$ -CD40 human	Kaninchen	1:500	Santa Cruz Biotechnologies
$\alpha$ -Kaninchen-IgG-HRP	Ziege	1:5000	Santa Cruz Biotechnologies
$\alpha$ -EBNA2-R3	Ratte	1:2	Elisabeth Kremer

### Wiederverwendung eines Western-Blots

Die Membran kann, nachdem die Antikörper entfernt worden sind erneut gefärbt werden. Um die Antikörper zu lösen, wurde die Membran für 30 Minuten bei 50°C in einer Waschlösung (125 mM Tris/HCL pH 6,8, 0,4% SDS, 10 mM DTT) inkubiert.

## 6.3 Zellkultur

### 6.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Die beschriebenen Methoden halten sich an leicht abgewandelte Protokolle von Torres und Kühn (1997) sowie Pasparakis und Kollias (1995). Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Umluft-Sterilbank (Heraeus, Düsseldorf) und unter Verwendung steriler Pipetten sowie Lösungen durchgeführt. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Zellen bei Zentrifugationsschritten bei 1200 rpm (ca. 300 x g) für 10 Minuten zentrifugiert. Für die Waschschrte wurde steriles PBS (Dulbecco, PAA Laboratories, Linz) verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die verschiedenen Zelltypen wurden in auf diese Zellen angepassten Medien kultiviert. Das Medium wurde bei embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) jeden Tag gewechselt, bei embryonalen Fibroblastenzellen (EF-Zellen) und bei 293-Zellen jeden zweiten Tag. Um bei adhärennten Zellen eine gute Festsetzung zu gewährleisten, wurden die Zellkulturplatten mit Gelatine beschichtet. Dazu wurden die Platten 15 Minuten mit einer Gelatinelösung inkubiert (2% Gelatine in PBS).

#### ES-Zell-Medium

500 ml	DMEM (Dulbeccos Mod Eagle Medium Gibco BRL Paisley, Schottland)
75 ml (12 %)	FKS (Fötales Kälberserum für ES- Zellkultur PAN, Afrika), (inaktiviert durch 45 min. Inkubation bei 56°C)
6 ml (1 %)	Sodium Pyruvat (100x), (Gibco BRL Paisley, Schottland)
6 ml (1 %)	Glutamin (100x), (Gibco BRL Paisley, Schottland)
6 ml (1 %)	Nicht essentielle Aminosäuren (100x), (Gibco BRL Paisley, Schottland)
1,2 ml	2- $\beta$ -Mercaptoethanol (50 mM)
0,8 ml	LIF (Leukämie inhibierender Faktor)

### EF-Zell-Medium

10 %	FKS (Fötales Kälberserum, Boehringer, Mannheim)
1 %	Sodium Pyruvat (100x Gibco BRL Paisley, Schottland)
89%	DMEM (Dulbecos Modified Eagle Medium mit Glutamax)

### B-Zell Medium für die Kultivierung von 293-, Raji-, und primären B-Zellen

500 ml	RPMI 1640 Medium (Gibco, Paisley, Schottland)
60 ml	FCS (Boehringer, Mannheim)
6 ml	Penicillin/Streptomycin (100x), (Gibco, Paisley, Schottland)
6 ml	Glutamin (100x), (Gibco, Paisley, Schottland)
6 ml	Pyruvat (100x), (Gibco, Paisley, Schottland)

#### 6.3.1.1 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte wurden Zellen der jeweiligen Kulturen 1:2 mit Trypanblau gemischt und auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen. Das Trypanblau diente der Identifizierung von toten Zellen, die diesen Farbstoff im Gegensatz zu lebenden aufnehmen. Mit Hilfe der Kammer konnte die Anzahl der lebenden Zellen in 1 µl Medium lichtmikroskopisch bestimmt werden.

#### 6.3.1.2 Trypsinieren von Zellen

Adhärente Zellen wurden zum Passagieren, Ernten oder Transfizieren durch kurzzeitige Behandlung mit dem proteolytischen Enzym Trypsin in Suspension gebracht. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 37°C warmem 1xTrypsin (Gibco BRL, Paisley Schottland) 4-8 Minuten inkubiert. Bei der Trypsinbehandlung von ES-Zellen wurde dem Trypsin noch 2% Hühnerserum zugesetzt, um die Reaktion weniger aggressiv zu machen. Die Enzymreaktion wurde danach mit dem Zweifachen Volumen Zellkulturmedium gestoppt, die Zellen wurden anschließend zentrifugiert, und je nach Verwendungszweck in Medium aufgenommen.

#### 6.3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Adhärente Zellen wurden zwei bis vier Stunden, Suspensionszellen einen Tag vor dem Einfrieren mit frischem Medium gefüttert. Zum Einfrieren wurden sie in Einzelzellsuspension gebracht, zentrifugiert und in kaltem Einfriermedium (50 % FKS; 10 % DMSO; 40 % Medium) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in Einfrier-Röhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) zunächst bei -80°C eingefroren und nach zwei Tagen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Um ein zu schnelles Einfrieren zu verhindern, wurden die Röhrchen in Styroporständler gestellt. Zum Einfrieren der Zellen in 96-Loch-Platten wurden diese ebenfalls trypsiniert, durch mehrfaches Pipettieren in Einzelzellsuspension gebracht und

die Reaktion durch 2fach konzentriertes Einfriermedium abgestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Mineralöl überschichtet und die Platten mit Parafilm versiegelt. Danach wurden die Platten mit Zellstoff umwickelt und bei -80°C eingefroren. So eingefrorene Zellen wurden spätestens nach 2 Monaten erneut kultiviert, da die Lebensdauer der Zellen bei -80°C begrenzt ist.

Beim Auftauen wurden die Zellen durch Zugabe von Medium schnell auf 37°C erwärmt und im 10 fachen Volumen Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen, um das DMSO zu entfernen, zentrifugiert und in neuem Medium aufgenommen.

#### **6.3.1.4 Kultivierung von embryonalen Fibroblastenzellen (EF-Zellen)**

Um zu verhindern, dass die ES-Zellen während der Kultivierung ihre Pluripotenz durch Differenzierung verlieren, wurden sie unter Zugabe von LIF (Leukämie inhibierender Faktor) auf einer Zellschicht von mitotisch inaktivierten EF-Zellen gehalten. Diese „feeder“-Zellen besaßen Vierfachresistenz (Quadrupel-Resistenz) gegen Neomycin (G418), 6-Thioguanin, Hygromycin und Puromycin (Trucker et al., 1997). Die „feeder“-Zellen wurden etwa alle 3-4 Tage expandiert. Nur EF-Zellen, die maximal dreimal expandiert worden waren, wurden für die Kultivierung von ES Zellen verwendet.

#### **6.3.1.5 Mitotische Inaktivierung von EF-Zellen**

EF-Zellen müssen, bevor man sie zur Kultivierung von ES-Zellen verwenden kann, mitotisch inaktiviert werden. Diese Inaktivierung erfolgt mit Hilfe des aus dem Pilz *Streptomyces caespitosus* stammenden Zellgiftes Mitomycin C. Da es die beiden DNA-Stränge durch alkylierende Reaktionen kovalent quervernetzt, verhindert es weitere Zellteilungen. Die Zellen wurden zunächst 1x mit PBS gewaschen und anschließend mit Mitomycin C-haltigem (10µg/ml) EF-Medium 2-4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Um die Zellen in geeigneter Dichte (s. Tab. M2) ausplattieren zu können, wurden die Zellen mit Trypsin behandelt und ihre Anzahl mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer) bestimmt.

#### **6.3.1.6 Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)**

Da die ES-Zellen für die Generierung transgener Mäuse genutzt wurden, musste bei der Kultivierung in besonderem Maße darauf geachtet werden, dass sie nicht differenzierten. Daher wurden die Zellen auf EF-Zellen gezüchtet und zusätzlich dem Medium LIF (Leukämie inhibierender Faktor) zugegeben, was einer Differenzierung entgegenwirkt (Smith

1988, Williams 1988). Außerdem wurde vermieden, dass die Zellen zu dicht wuchsen, indem sie alle 3-4 Tage erneut in einer Dichte von etwa  $1,9 \times 10^4$  Zellen je  $\text{cm}^2$  ausplattiert wurden.

Leukämie inhibierender Faktor: Das von LIF-CHO-Zellen (Genetic Institute Cambridge, Massachusetts, USA) sezernierte Cytokin LIF wurde von Angela Egert (Institut für Genetik Köln) zur Verfügung gestellt.

### ***6.3.2 Transfektion von ES-Zellen***

#### **6.3.2.1 Generierung stabiler ES-Zellklone**

##### **Transfektion**

Je Transfektion wurden ca.  $1 \times 10^7$  ES-Zellen eingesetzt, die vorher einmal mit PBS gewaschen wurden und anschließend in 700  $\mu\text{l}$  Transfektionspuffer (RPMI 1640 w/o Phenolred, Gibco, Paisley, Schottland) aufgenommen wurden. Anschließend wurden 30  $\mu\text{g}$  des linearisierten und über eine Phenol Chlorophom-Extraktion gereinigten Targeting-Vektors, der in 100  $\mu\text{l}$  Transfektionspuffer aufgenommen war, zugesetzt. Danach wurde die DNA-Zellsuspension in eine Elektroporationsküvette (Biorad, Gene Pulser Küvette, 0,4 cm Elektrode; Biorad, Hercules, USA) überführt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in einem Elektroporator (Biorad, Hercules, USA) bei 230 mV und 500  $\mu\text{F}$ . Nach der Elektroporation wurden die Zellen nochmals für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf einer EF-Zell-beschichteten 10-cm-Platte ausplattiert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden  $1 \times 10^3$  Zellen vor und nach der Transfektion dem Ansatz entnommen und auf zwei 5-cm-Platten kultiviert. Diese Zellen wurden in normalem ES-Zellmedium kultiviert, bis die auf ihnen wachsenden Kolonien gut zu erkennen waren. Sechs Tage nach der Transfektion wurden die Kolonien gezählt und so der Anteil der bei der Transfektion gestorbenen Zellen bestimmt.

##### **Selektion**

Die erfolgreich transfizierten Zellen wurden über die Zugabe von G418-Sulfat (0,177mg/ml aktives Geneticin) selektioniert, da der Vektor ein Neomycinresistenzgen enthielt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde mit der Selektion begonnen.

Selektionsmedium: 99,75 ml ES-Medium (s. Material und Methoden 3.4.) mit 0,25 ml G418-Sulfat (Geneticin 10 mg/ml 71 % Aktivität der Droge)

### **Vereinzeln und Expandieren von ES-Zell-Kolonien**

Neun bis elf Tage nach der Transfektion waren auf den mit G418-behandelten Platten fast ausschließlich Kolonien mit G418-resistenten Zellen zu sehen. Zum Vereinzeln der Klone wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml PBS überschichtet. Mit Hilfe einer Pipette (p-200) wurde dann unter einem Stereomikroskop (Nikon, Tokio, Japan) in einer Gegenstrom-Sterilbank einzelne Kolonien in 25 µl PBS aufgenommen. Die Kolonien wurden jeweils in ein Loch einer 96-Loch-Platte (Rundboden) transferiert und 25 µl 2x Trypsin hinzugegeben. Nach einer kurzen Inkubation bei 37°C wurden sie durch Pipettieren in Einzelzellsuspension gebracht und die Trypsinreaktion mit 100 µl Medium gestoppt. Anschließend wurden die Klone jeweils in Triplikaten auf mit EF-Zellen beschichtete 96-Loch-Platten ausplattiert. Danach wurden je Loch weiter 100 µl Selektionsmedium zugegeben. Nach etwa drei Tagen, als in 50 % der Löcher die Zellen eine optimale Dichte erreicht hatten, wurde eine der drei Platten eingefroren. Vor dem Einfrieren wurde der Zustand der einzelnen Klone protokolliert. Die zweite Platte wurde am darauf folgenden Tag eingefroren. Die dritte Platte wurde auf zwei mit Gelatine behandelte 96-Loch-Platten aufgeteilt. Diese Zellen wurden später verwendet um DNA für eine erste Analyse der Klone zu gewinnen.

### ***6.3.3 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen***

#### **6.3.3.1 Transiente Transfektion von 293-Zellen**

Je Transfektion wurden  $1 \times 10^7$  Zellen verwendet, die vorher einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 250 µl serumfreiem Medium (RPMI 1640) aufgenommen wurden. Danach wurde 10 µg sterile DNA in einem Volumen von maximal 20 µl zugegeben. Nach kurzem Mischen wurden die Zellen dann in eine Elektroporationsküvette („Gene Pulser Cuvette“ Biorad, Hercules, USA) überführt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Transfektion bei 250 mV und 960 µF in einem Elektroporator der Firma Biorad (Hercules, USA) durchgeführt. Nach der Transfektion wurden die Zellen direkt in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und kultiviert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen dann für die Protein-Extraktion lysiert.

#### **6.3.3.2 Transiente Transfektion von ES-Zellen mit dem Plasmid pGK-cre-bpA**

Die transiente Transfektion wurde genutzt, um in den ES-Zellen *in vitro* cre-vermittelte Deletion durchzuführen. Je Transfektion wurden  $1 \times 10^7$  Zellen mit 25 µg Plasmids pGK-cre-

bpA in 800 µl Transfektionsmedium (RPMI 1640 w/o Phenolred, Gibco, Paisley, Schottland) gelöst und bei 230 mV und 500 µF elektroporiert. Von den transfizierten Zellen wurden je  $3,3 \times 10^6$  Zellen auf zwei 10-cm-Platten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Trypsin behandelt und auf 10-cm-Platten mit den Dichten  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $2,5 \times 10^3$  und  $5 \times 10^3$  ausplattiert. Nach 6 Tagen wurden dann einzelne Kolonien wie bereits beschrieben isoliert und 2/3 der Zellen einer Kolonie auf Neo<sup>r</sup>-EF-Zellen und 1/3 auf EF-Zellen mit Quadrupel-Resistenz in 96-Loch-Platten ausplattiert. Während die Zellen auf der Platte mit den Quadrupel-Resistenz EF-Zellen in ES-Zellmedium ohne G418 gezogen wurden, wurden die Zellen auf der anderen Platte mit G418-haltigem Medium überschichtet. Das Selektionsmedium enthielt 20 mg/ml G418-Sulfat (71 % Aktivität). Nach 3 Tagen starben die neomycinresistenten Klone auf der mit Selektionsmedium überschichtete Platte, da bei erfolgreicher Deletion das *neo<sup>r</sup>*-Gen ebenfalls deletiert wurde. Die sensitiven Klone wurden von der Replikatplatte ausgehend für weitere Versuche vermehrt, sowie Zellen für die Gewinnung von DNA auf eine mit Gelatine behandelte 48-Loch-Platte gegeben.

### **6.3.4 Kultivierung primärer Lymphozyten**

Die aus der Milz von Mäusen isolierten Zellen (siehe 1.4.2) wurden entweder direkt in Kulturmedium aufgenommen oder nach Reinigung der B-Zellen (siehe 1.4.3) in Kultur genommen. Für die Kultivierung wurden in 96-Loch-Platten je Loch  $5 \times 10^5$  Zellen in 200 µl B-Zell Medium kultiviert. Je nach Versuch wurden einige der Zellen mit agonistischen α-CD40-Antikörpern (2,5 µg/ml), Interleukin 4 (IL4; 1 µg/ml), Lipopolysacchariden (LPS; 0,1 mg/ml) oder Kombinationen dieser Stimuli, CD40 + IL4 und CD40 + LPS, kultiviert. Die Zellen wurden bis zu fünf Tage in Kultur gehalten und über FACS-Analysen charakterisiert.

### **6.3.5 In vitro Proliferations-Assay**

Die Proliferationsrate von Milz-B-Zellen konnte durch die Markierung von isolierten B-Zellen (siehe 1.4.4) mit Carboxy-Fluoreszin-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) über mehrere Tage verfolgt werden. Bei CFSE handelt es sich um einen Succidimylester, der bei der Bindung an intrazelluläre Proteine zu einem fluoreszierenden Produkt umgesetzt wird. Bei einer Zellteilung wird er gleichmäßig mit den Proteinen an die Tochterzellen verteilt, wodurch diese dann nur noch halb so stark fluoreszieren wie die Mutterzelle.

Für die Markierung mit CFSE wurden die Zellen zunächst zweimal mit RPMI ohne Zusätze gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 37°C warmem RPMI mit 5 µM CFSE aufgenommen und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde das fünffache Volumen von



kaltem B-Zell Medium den Zellen zugegeben und diese anschließend für 10 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen dann in B-Zell Medium aufgenommen und wie unter 1.3.5 beschrieben mit verschiedenen Zusätzen kultiviert. Nach fünf Tagen wurde die Fluoreszenz der Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt.

## **6.4 Generierung und Analyse von transgenen Mäusen**

### ***6.4.1 Erzeugung transgener Mäuse***

Der LMP1/CD40<sup>fistOPP</sup>-Mausstamm wurde aus Zellen des Balb C Inbred Stammes generiert.

Diese wurden entweder mit CD19-cre oder CD21-cre Mäusen gekreuzt (mit C57/BL-Hintergrund). Um den genetischen Hintergrund der Analysemause konstant zu halten, wurden für die Charakterisierung der LMP1/CD40-exprimierenden Mäuse nur F1 Tiere verwendet. Lediglich bei den CD40-defizienten Tieren (Balb C-Hintergrund) handelt es sich nicht um F1 Tiere, da die Allele durch mehrfache Kreuzungen entstanden sind. Die Mäuse wurden unter SPF (specific pathogen free)- Bedingungen gehalten. Für die Analysen wurden in der Regel acht bis sechzehn Wochen alte Tiere verwendet. Ausnahmen sind als solche gekennzeichnet.

Der Genotyp jeder Maus wurde durch PCR- Analysen mit Schwanz-DNA bestimmt.

### ***6.4.2 Präparation primärer Maus Lymphozyten***

Die Mäuse wurden zunächst durch 8-minütige CO<sub>2</sub> Begasung in einem geschlossenen Behälter getötet und anschließend direkt präpariert. Die Milz, sowie die Lymphknoten, die Peyerschen Plaques und der Thymus wurden als ganze Organe entnommen. Um die lymphatischen Zellen aus dem Gewebeverbund zu lösen, wurden die Gewebe durch ein feines Sieb gedrückt. Die Zellen der Peritonealhöhle wurden durch Ausspülen des Bauchraums mit Zellmedium (RPMI 1640, 5% FKS, 1% Pen/Strep, 1% Glutamin) gewonnen. Für die Präparation des Knochenmarks wurde der Schienbeinknochen präpariert. Bei der Präparation mit anschließender Zellsortierung durch MACS wurden zusätzlich die Oberarmknochen der Tiere entnommen. Die Knochen wurden zur Isolation der Zellen angeschnitten und mit Medium ausgespült.

Bei blutreichen Geweben wie der Milz und dem Knochenmark wurde eine Lyse der Erythrozyten vorgenommen. Dazu wurden die Zellen zunächst für 6 Minuten bei 4°C und 200 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in Erythrozyten – Lysepuffer (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM; Tris 170 mM (pH 7,65) im Verhältnis 9:1 frisch ansetzen) aufgenommen.

Die Lyse wurde nach 2 Minuten mit Zellmedium gestoppt und die Zellen nach erneutem Zentrifugieren (300 x g; 4°C; 6 Min.) in 1ml Zellmedium aufgenommen. Während der gesamten Präparation und der späteren Analyse wurden die Zellen auf Eis kühl-gehalten.

#### ***6.4.3 Isolierung von B-Zellen aus der Maus***

Die Organe wurden wie unter 1.4.2 beschrieben aus den Mäusen isoliert und anschließend durch „Magnetic Cell Sorting“ (MACS)-Separation (Miltenyi Biotec) die B-Zellen isoliert. Dabei werden an magnetische Kügelchen, an die spezifische Antikörpern gekoppelt sind, die Zellen gebunden. Anschließend werden die Zellen auf eine Säule geladen, die sich in einem starken magnetischen Feld befindet. Die Zellen mit den Kügelchen werden durch das Magnetfeld angezogen und bleiben in der Säule, während die ungebundenen Zellen die Säule passieren können.

Für die Präparation von DNA aus B-Zellen wurden  $\alpha$ -CD19-Antikörper gekoppelt mit „MicroBeads“ von Miltenyi Biotec verwendet, die spezifisch an CD19- positive B-Zellen binden. Die CD19 positiven Zellen wurde mit Hilfe einer Separationssäule (Miltenyi Biotec) nach Firmenprotokoll isoliert. Sollten die Zellen nach der Separation noch kultiviert werden, wurden  $\alpha$ -CD43-Antikörper gekoppelte MicroBeads und LD-Depletions-Säulen verwendet. Bei diesen wurden die CD43-positiven Nicht-B-Zellen in der Säule gebunden und die B-Zellen ausgewaschen. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die B-Zellen keinen Antikörper binden, der sie möglicherweise aktiviert. Auch bei diesen Versuchen wurde nach Firmenprotokoll verfahren.

#### ***6.4.4 Immunisierung von Mäusen***

Je Maus wurden 100 $\mu$ g des Antigens (NP-CGG<sub>17</sub> von Bioresearch Technologies Novato CA) ein 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl haptan, durch Kaliumaluminiumsulfat gefällt, da das Immunsystem der Mäuse mit dem Antigen in der präzipitierten und größeren Form besser reagiert. Für die Präzipitation wurde ein Volumen des Antigens mit einem Volumen 10%igem  $KAl(SO_4)_2$  gemischt und mit 1 N NaOH auf pH 6,5 eingestellt. Dann wurde die Probe für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 4200rpm (Minifuge Sigma) zentrifugiert. Danach wurde noch dreimal mit sterilem PBS gewaschen und jeweils für 10 Minuten bei 4200rpm (Minifuge Sigma) zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Antigen in 200 $\mu$ l sterilem PBS aufgenommen und den Mäusen intraperitoneal gespritzt. Es wurden nur Mäuse im Alter von 8-16 Wochen immunisiert und 7, 14 oder 21 Tage nach Immunisierung präpariert und analysiert.

### **6.4.5 Durchflusszytometrie**

Für die Analyse über Durchflusszytometrie müssen die Zellen als Einzelzellen vorliegen, was durch das unter 1.4.2 beschriebene Verfahren erreicht wird. Die Zellen wurden zuerst mit FACS-Puffer (PBS; 1% BSA) gewaschen, um mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Anschließend wurden sie mit einer Kombination von FITC-, PE-, Cy-Chrome-(Cyc) oder FITC-, PE-, PerCP- und APC-konjugierten monoklonalen Antikörpern gefärbt, die in FACS-Puffer verdünnt waren. Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen für 20 Minuten gefärbt und dann nochmals in FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Puffer für die Analyse aufgenommen. Bei Färbungen mit FITC, PE und Cy-Chrom wurde zusätzlich TOPRO-3 (Molecular Probes) zugegeben, um die toten Zellen anzufärben.

Alle Analysen wurden mit einem FACSCalibur<sup>TM</sup> (BD-Biosciences) durchgeführt und die Resultate mit der CELLQuest<sup>TM</sup> Software ausgewertet. Es wurden je Färbung  $3 \times 10^4$  lebendige Zellen aufgenommen, die sich innerhalb des „Lymphozyten-Fensters“, welches durch eine bestimmte Größe der Zellen und die lichtbrechenden Eigenschaften der Zelle definiert ist, befanden. Zusätzlich wurden auch noch die TOPRO-3-positiven und somit toten Zellen aus dieser Population ausgeschlossen. Da die Färbungen teilweise in ihrer Intensität variieren, wurden bei jeder Analyse Zellen von Kontrollen mitgefärbt, um die Populationen in den transgenen Mäusen definieren zu können.

#### **Antikörper für FACS-Färbungen:**

Fluorochrom gekoppelte Antikörper gegen B220 (RA3-6B2), CD4 (RM4-5), CD5 (53-7.3), CD8 (53-6.7), CD21 (7G6), CD23 (B3B4), CD43 (S7), CD44 (IM7), CD80 (16-10A1), CD95 (Jo2), IgD (11-26c.2a), IgG1 (A85-1) und IgM (R6-60.2) wurden von BD-Bioscience und CD62L (MEL-14) von Immunotech bezogen. Zusätzliche monoklonale Antikörper gegen CD54 (190) und CD86 (161) wurden freundlicherweise von Josef Mysliwietz und Elisabeth Kremmer zur Verfügung gestellt. PNA-FITC wurde von Vector Linearis (Wertheim) bezogen.

### **6.4.6 Immunohistochemie von Gefrierschnitten**

Um gute Gefrierschnitte der Organe zu erhalten, wurden diese möglichst innerhalb kurzer Zeit nach der Präparation in OCT eingelegt und zum Gefrieren auf Trockeneis gestellt. Anschließend konnten sie bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Für die Färbungen wurden  $8\text{ }\mu\text{m}$  dicke Schnitte mit einem Kryotom angefertigt, diese danach getrocknet und in 100% Aceton fixiert.

Anschließend wurden die Schnitte wiederum 20 Minuten getrocknet, kurz in PBS gewaschen und dann 20 Minuten mit Blocklösungs- (10 % Ziegenserum, 0,1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 % BSA in PBS) in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre bei RT inkubiert. Auch alle folgenden Blockierung- und Färbeschritte wurden in einer Kammer mit gesättigter Atmosphäre durchgeführt. Danach wurden die Schnitte zur Blockierung unspezifischer Biotin- oder Avidin-Bindestellen nochmals mit zwei verschiedenen Blocklösungen (Avidin/Biotin Blocking Kit von Vector Laboratories) je 15 Minuten inkubiert, was jeweils von einem fünfminütigen Waschschrift in PBS unterbrochen wurde die Proben. Im Anschluss daran wurden die verschiedenen Antikörper je eine Stunde bei RT, oder über Nacht bei 4°C, inkubiert. Zwischen den verschiedenen Antikörper- Schritten wurde jeweils drei Mal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte noch mit Streptavidin gekoppelter Phosphatase (Sigma) für 30 Minuten inkubiert und nochmals gewaschen.

Streptavidin gekoppelte Antikörper wurden mit Hilfe des „Alkaline Phosphate Substrate Kit“ (Vector laboratories) in Blau und Peroxidase gekoppelte Antikörper durch eine Reaktion mit 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) „Peroxidase Substrate Kit“ (Vector laboratories) in Rot nachgewiesen. Die Farbreaktionen wurden durch Waschen der Schnitte in PBS gestoppt, die gefärbten Schnitte danach getrocknet und anschließend eingebettet. Die Aufnahmen der Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (Zeiss, Jena) untersucht, mit einer Digitalkamera (RS Photometrics) aufgenommen und im Programm Openlab from Improvision und Adobe Photoshop Software gesichert.

#### **Nachweis der B und T-Zellen:**

Peroxidase konjugierter  $\alpha$ -Maus-IgM- (Sigma), Ratte  $\alpha$ -Maus-CD3- (freundlicherweise von Elisabeth Kremer zur Verfügung gestellt) und biotinylierter  $\alpha$ -Ratte-IgG1- (Jackson Laboratories), um die  $\alpha$ -CD3-Antikörper zu detektieren.

#### **Nachweis der Follikelstruktur und des umgebenden marginalen Sinus:**

Peroxidase konjugierter  $\alpha$ -Maus IgM (Sigma), Ratte  $\alpha$ -Maus MOMA1; T-2011 (BMA) und biotinylierter  $\alpha$ -Ratte IgG1(Jackson Laboratories), um den  $\alpha$ -MOMA-Antikörper zu detektieren.

#### **Nachweis der Keimzentren und der follikulären Struktur:**

Peroxidase konjugierter  $\alpha$ -Maus-IgM (Sigma), biotinyliertes „peanut agglutinin (PNA) (Vector laboratories).

### **6.4.7 Präparation von Blutserum aus Mäuseblut**

Für die Gewinnung von Seren wurde den Mäusen vor und nach der Immunisierung Blut von der Schwanzvene abgenommen. Bei der Präparation der Mäuse wurde das Blut direkt dem Herzen entnommen. Danach wurde das Blut für mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000 rpm in einer auf 4°C gekühlten Minifuge zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen. Dieser Schritt wurde, um ein möglichst sauberes Serum zu gewährleisten, noch zweimal wiederholt.

### **6.4.8 „Enzyme linked immuno sorbent assay“ (ELISA)**

Mit dieser Methode kann die Serum-Konzentration von sezernierten Antikörpern mit einer bestimmten Antigenspezifität und/oder einem bestimmten Immunglobulin-Isotyp bestimmt werden. Dazu werden die entsprechenden Antigene bzw. isotypspezifischen Antikörper an eine 96-Lochplatte gekoppelt. Anschließend inkubiert man die Platten mit den zu untersuchenden Seren in verschiedenen Verdünnungen. Die spezifisch gebundenen Antikörper können dann mit Hilfe von biotinylierten Immunglobulin-isotypspezifischen Antikörpern und einer streptavidin-gekoppelten alkalischen Phosphatase in einer enzymatischen Farbreaktion quantifiziert werden.

#### **6.4.8.1 Bestimmung der spezifischen Standard- Immunglobulinspiegel**

96 Lochplatten wurden mit 5µg/ml der Ig-isotypspezifischen Ratte-anti-Maus Antikörper (je nach Isotyp: IgM, II/41; IgG1, A85-3; IgG2a, R11-8; IgG2b, R9-91; IgG3, R2-38; IgA, C11-3 von BD Bioscience) in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> Puffer (pH 9,2) beschichtet. Danach wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden danach mit Blockpuffer (1% Milch in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS-M)) durch Inkubation für 30 Minuten bei RT abgesättigt. Im Anschluss wurden die Seren in Verdünnungen von 1:50 bis 1:10240 in PBS-M aufgetragen. Nach einer Inkubation von 1 Std. bei RT und anschließendem dreimaligem Waschen mit PBS wurde je nach Isotyp der biotinylierte sekundäre Antikörper (IgM-Bio, R6-60.2; IgG1-Bio, A85-1; IgG2a-Bio, R19-15; IgG2b-Bio, R12-3; IgG3-Bio, R40-82; IgA-Bio, C10-1 (BD Bioscience)) zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei RT und dreimaligem Waschen der Platten mit PBS wurde Streptavidin-gekoppelte Alkaline Phosphatase zugegeben. Nach 30 Minuten wurde nochmals dreimal mit PBS gewaschen und die Anwesenheit der Phosphatase durch Zugabe von O-phenyldimine (Sigma) in 0,1 M Citric acid- Puffer mit 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat nachgewiesen. Die auftretende Farbreaktion wurde bei 405nm mit einem Mikrotiterplatten-Leser (Photometer Sunrise RC, Tecan) gemessen. Um

die Immunglobulin-Mengen zu quantifizieren wurden je Platte Ig spezifische Standards mit bekannter Menge ebenfalls in den verschiedenen Verdünnungen aufgetragen (IgM, G155-228; IgG1, MOPC-31-C; IgG2a, G155-178; IgG2b, MPC-11; IgG3, A112-3; IgA, M18-254).

#### **6.4.8.2 Bestimmung der NP spezifischen Immunglobulinspiegel**

Die Platten wurden für den Nachweis NP-spezifischer Antikörper mit 5µg/ml NP17-BSA (Biosearch Technologies) und für den Nachweis hoch affiner Antikörper mit 5µg/ml NP2-BSA (Biosearch Technologies) beschichtet. Die Zugabe der Seren sowie die weiteren Schritte erfolgten genau wie beim Nachweis der spezifischen Antikörper. Es wurden nur NP-spezifische Antikörper mit den Isotypen IgM und IgG1 bestimmt. Zur Quantifizierung der α-NP-IgM- und IgG1-Antikörper wurden folgende Standards verwendet: IgM1, 267.7; IgMb B1-8; IgG1a, 18-1-16; IgG1b, N1G9.

#### **6.4.9 Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)**

##### **Extraktion von Kernproteinen**

Für die Extraktion der Kernproteine wurden Mäuse im Alter von 15-18 Wochen verwendet. Es wurden zunächst die B-Zellen durch MACS-Sortierung siehe (6.4.3) gewonnen und die Zellen anschließend in einer Dichte von  $2 \times 10^7$ /ml in Kultur-Medium (1% FKS, 1xPenStrep, 1% Glutamin,  $10^{-7}$  M β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Anschließend wurden sie mit je  $2 \times 10^7$  Zellen pro Loch in einer 12-Loch-Platte für 1 Std. bei 37°C ruhen gelassen. Dann wurden optional Reagentien zugegeben. Für die CD40-Stimulation wurden 5µg/ml agonistische α-CD40-Antikörper und für die IgM Stimulation 10µg/ml agonistische α-IgM-Antikörper zugesetzt. Anschließend wurden die mit CD40 stimulierten Zellen für eine Stunde und die mit IgM stimulierten Zellen für vier Stunden bei 37°C kultiviert. Danach wurden die Zellen in 15 ml Röhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit kaltem PBS wurden sie in 800 µl Puffer A (10 mM HEPES pH 7.9; 10 mM KCL; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT (frisch zugesetzt); 1mM Proteinaseinhibitoren („Compleet“ EDTA free Roche) (frisch zugesetzt) aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden 50 µl NP40 zugesetzt, welches spezifisch die Zellmembranen aufbricht, jedoch die Kernmembran nicht beeinflusst. Die Proben wurden dann bei 4°C für 5 Minuten bei höchster Geschwindigkeit geschüttelt (Vortexer) und anschließend die Zellkerne durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 15000 rpm und 4°C sedimentiert. Die Zellkerne wurde dann je nach Sedimentgröße in 15-30 µl Puffer C (20 mM HEPES (pH 7.9), 0,4 M KCL, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT (frisch

### Radioaktive Markierung eines Oligonukleotids für EMSA-Analysen

Das einzelsträngige Oligo (Oligonukleotid) wurde zunächst in einer Reaktion mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase mit Gamma-ATP radioaktiv markiert. (Ansatz der Markierungsreaktion: 2 µl Oligo (300-600 ng), T4 Kinase 2 µl, 5x forward- Puffer 10 µl Gamma ATP 5 µl, 31µl H<sub>2</sub>O). Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend das spezifische Oligonucleotid mit Hilfe einer G25 Säule gereinigt. Danach wurden 2 µl des komplementären Oligonucleotids (Menge) zugegeben, durch Inkubation für 5 Minuten in kochendem Wasser zusammen mit dem markierten Oligonucleotid denaturiert und anschließend durch Abkühlung im Kühlraum aneinander gebunden. Anschließend wurde der Grad der Markierung gemessen im szintillations-Zähler (Bioscan, Washington USA) und die Probe auf eine finale Konzentration von  $1 \times 10^5$  cpm/µl eingestellt.

NFkB Oligo A:	ATC AGG GAC TTT CCG CTG GGG ACT TTC CG
NFkB Oligo B:	CGG AAA GTC CCC AGC GGA AAG TCC CTG AT
Oct1 Oligo A:	CTA GTG TCG AAT GCA AAT CAC TAG AAT
Oct1 Oligo B:	ATT CTA GTG ATT TGC ATT CGA CAC TAG

### Bindereaktion von Kernproteinen an eine radioaktiv markierte Probe

Die Proteinkonzentrationen der Kernextrakte wurden gemessen und mit Puffer- C (siehe 1.4.9.1) gegeneinander abgeglichen. Anschließend wurden sie je einzeln der Bindereaktion zugesetzt. Ansatz der Bindereaktion: Protein 5 µl (3-4 µg); 4x Bindepuffer w/o-DTT; 1 µl poly dIdC (1µg/ml); 4 µl H<sub>2</sub>O; 5 µl Probe ( $5 \times 10^5$ cpm)

Die Ansätze wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann 2µl 10xDNA Lade-Puffer zugesetzt und die Proben anschließend auf ein nicht-denaturierendes Gel geladen.

### Antikörper für EMSA

Santa Cruz Biotechnologies p50 (sc114), p52(sc), p65(sc372), Rel-b (sc226), c-Rel (sc70x)

### **Gellauf**

Die Proben wurden auf einem Polyacrylamidgel (5% Acrylamid (Rotiphorese Gel 30, Roth), 0,5xTBE; 0,1 % APS (Amoniumperoxydisulfat), 0,002 % TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin)) im elektrischen Feld bei 200V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf ein Whatmanpapier gelegt und mit Hilfe eines Gelrockners (BioRad) unter Vakuum und Wärmeeinwirkung getrocknet (80 °C, 2 Std.). Anschließend wurde eine Phospho- Imagerplatte je nach Signalstärke für 4-16 Stunden aufgelegt und mit Hilfe eines Phospho Imagers (BasReader, Fuji) ausgewertet.



## 7 Literatur

- Allman, D., A. Jain, A. Dent, R.R. Maile, T. Selvaggi, M.R. Kehry, and L.M. Staudt. 1996. BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood*. 87:5257-68.
- Babcock, G.J., D. Hochberg, and A.D. Thorley-Lawson. 2000. The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity*. 13:497-506.
- Baichwal, V.R., and B. Sugden. 1988. Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene*. 2:461-7.
- Banchereau, J., and F. Rousset. 1991. Growing human B lymphocytes in the CD40 system. *Nature*. 353:678-9.
- Basso, K., U. Klein, H. Niu, G.A. Stolovitzky, Y. Tu, A. Califano, G. Cattoretti, and R. Dalla-Favera. 2004. Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood*.
- Benschop, R.J., and J.C. Cambier. 1999. B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. *Curr Opin Immunol*. 11:143-51.
- Berberich, I., G.L. Shu, and E.A. Clark. 1994. Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *J Immunol*. 153:4357-66.
- Bornkamm, G.W., J. Hudewentz, U.K. Freese, and U. Zimmer. 1982. Deletion of the nontransforming Epstein-Barr virus strain P3HR-1 causes fusion of the large internal repeat to the DSL region. *J Virol*. 43:952-68.
- Bossy, D., M. Milili, J. Zucman, G. Thomas, M. Fougereau, and C. Schiff. 1991. Organization and expression of the lambda-like genes that contribute to the mu-psi light chain complex in human pre-B cells. *Int Immunol*. 3:1081-90.
- Busch, L.K., and G.A. Bishop. 1999. The EBV transforming protein, latent membrane protein 1, mimics and cooperates with CD40 signaling in B lymphocytes. *J Immunol*. 162:2555-61.
- Caldwell, R.G., J.B. Wilson, S.J. Anderson, and R. Longnecker. 1998. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity*. 9:405-11.
- Casola, S., K.L. Otipoby, M. Alimzhanov, S. Humme, N. Uyttersprot, J.L. Kutok, M.C. Carroll, and K. Rajewsky. 2004. B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol*. 5:317-27.
- Castigli, E., F.W. Alt, L. Davidson, A. Bottaro, E. Mizoguchi, A.K. Bhan, and R.S. Geha. 1994. CD40-deficient mice generated by recombination-activating gene-2-deficient blastocyst complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:12135-9.
- Chan, F.K., H.J. Chun, L. Zheng, R.M. Siegel, K.L. Bui, and M.J. Lenardo. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*. 288:2351-4.
- Cohen, J.I. 2000. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 343:481-92.
- Cohen, J.I., F. Wang, and E. Kieff. 1991. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 mutations define essential domains for transformation and transactivation. *J Virol*. 65:2545-54.
- Coope, H.J., P.G. Atkinson, B. Huhse, M. Belich, J. Janzen, M.J. Holman, G.G. Klaus, L.H. Johnston, and S.C. Ley. 2002. CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *Embo J*. 21:5375-85.
- Cordier, M., A. Calender, M. Billaud, U. Zimmer, G. Rousselet, O. Pavlish, J. Banchereau, T. Tursz, G. Bornkamm, and G.M. Lenoir. 1990. Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J Virol*. 64:1002-13.

- Cormary, C., E. Hiver, B. Mariame, G. Favre, and A.F. Tilkin-Mariame. 2005. Coexpression of CD40L and CD70 by semiallogenic tumor cells induces anti-tumor immunity. *Cancer Gene Ther.*
- Cosgrove, D., D. Gray, A. Dierich, J. Kaufman, M. Lemeur, C. Benoist, and D. Mathis. 1991. Mice lacking MHC class II molecules. *Cell.* 66:1051-66.
- Craig, F.E., M.L. Gulley, and P.M. Banks. 1993. Posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol.* 99:265-76.
- Cron, R.Q. 2003. CD154 transcriptional regulation in primary human CD4 T cells. *Immunol Res.* 27:185-202.
- Cyster, J.G., S.B. Hartley, and C.C. Goodnow. 1994. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature.* 371:389-95.
- Dallman, C., P.W. Johnson, and G. Packham. 2003. Differential regulation of cell survival by CD40. *Apoptosis.* 8:45-53.
- Devergne, O., E. Hatzivassiliou, K.M. Izumi, K.M. Kaye, M.F. Kleijnen, E. Kieff, and G. Mosialos. 1996. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol.* 16:7098-108.
- Edry, E., and D. Melamed. 2004. Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol.* 173:4265-71.
- Eliopoulos, A.G., J.H. Caamano, J. Flavell, G.M. Reynolds, P.G. Murray, J.L. Poyet, and L.S. Young. 2003. Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF-kappaB2 to p52 via an IKKgamma/NEMO-independent signalling pathway. *Oncogene.* 22:7557-69.
- Erickson, L.D., B.G. Durell, L.A. Vogel, B.P. O'Connor, M. Cascalho, T. Yasui, H. Kikutani, and R.J. Noelle. 2002. Short-circuiting long-lived humoral immunity by the heightened engagement of CD40. *J Clin Invest.* 109:613-20.
- Fagarasan, S., N. Watanabe, and T. Honjo. 2000. Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. *Immunol Rev.* 176:205-15.
- Farrell, P.J., D.T. Rowe, C.M. Rooney, and T. Kouzarides. 1989. Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *Embo J.* 8:127-32.
- Ferrari, S., S. Giliani, A. Insalaco, A. Al-Ghonaium, A.R. Soresina, M. Loubser, M.A. Avanzini, M. Marconi, R. Badolato, A.G. Ugazio, Y. Levy, N. Catalan, A. Durandy, A. Tbakhi, L.D. Notarangelo, and A. Plebani. 2001. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:12614-9.
- Forster, R., A.E. Mattis, E. Kremmer, E. Wolf, G. Brem, and M. Lipp. 1996. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell.* 87:1037-47.
- Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell.* 99:23-33.
- Freter, C.E. 1990. Acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphomas. *J Natl Cancer Inst Monogr:*45-54.
- Fruehling, S., and R. Longnecker. 1997. The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction. *Virology.* 235:241-51.
- Fruehling, S., R. Swart, K.M. Dolwick, E. Kremmer, and R. Longnecker. 1998. Tyrosine 112 of latent membrane protein 2A is essential for protein tyrosine kinase loading and regulation of Epstein-Barr virus latency. *J Virol.* 72:7796-806.

- Gaidano, G., P. Ballerini, J.Z. Gong, G. Inghirami, A. Neri, E.W. Newcomb, I.T. Magrath, D.M. Knowles, and R. Dalla-Favera. 1991. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:5413-7.
- Gao, Y., D.O. Ferguson, W. Xie, J.P. Manis, J. Sekiguchi, K.M. Frank, J. Chaudhuri, J. Horner, R.A. DePinho, and F.W. Alt. 2000. Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature*. 404:897-900.
- Gardby, E., and N.Y. Lycke. 2000. CD19-deficient mice exhibit poor responsiveness to oral immunization despite evidence of unaltered total IgA levels, germinal centers and IgA-isotype switching in Peyer's patches. *Eur J Immunol*. 30:1861-71.
- Gauss, G.H., and M.R. Lieber. 1996. Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination. *Mol Cell Biol*. 16:258-69.
- Gires, O., F. Kohlhuber, E. Kilger, M. Baumann, A. Kieser, C. Kaiser, R. Zeidler, B. Scheffer, M. Ueffing, and W. Hammerschmidt. 1999. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J*. 18:3064-73.
- Gires, O., U. Zimmer-Strobl, R. Gonnella, M. Ueffing, G. Marschall, R. Zeidler, D. Pich, and W. Hammerschmidt. 1997. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J*. 16:6131-40.
- Gordadze, A.V., R. Peng, J. Tan, G. Liu, R. Sutton, B. Kempkes, G.W. Bornkamm, and P.D. Ling. 2001. Notch1IC partially replaces EBNA2 function in B cells immortalized by Epstein-Barr virus. *J Virol*. 75:5899-912.
- Gratama, J.W., M.M. Zutter, J. Minarovits, M.A. Oosterveer, E.D. Thomas, G. Klein, and I. Ernberg. 1991. Expression of Epstein-Barr virus-encoded growth-transformation-associated proteins in lymphoproliferations of bone-marrow transplant recipients. *Int J Cancer*. 47:188-92.
- Gray, D., K. Siepmann, D. van Essen, J. Poudrier, M. Wykes, S. Jainandunsing, S. Bergthorsdottir, and P. Dullforce. 1996. B-T lymphocyte interactions in the generation and survival of memory cells. *Immunol Rev*. 150:45-61.
- Grech, A.P., M. Amesbury, T. Chan, S. Gardam, A. Basten, and R. Brink. 2004. TRAF2 differentially regulates the canonical and noncanonical pathways of NF-kappaB activation in mature B cells. *Immunity*. 21:629-42.
- Greiner, A., S. Tobollik, M. Buettner, B. Jungnickel, K. Herrmann, E. Kremmer, and G. Niedobitek. 2005. Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma. *J Pathol*. 205:541-7.
- Grossman, S.R., E. Johannsen, X. Tong, R. Yalamanchili, and E. Kieff. 1994. The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:7568-72.
- Guttridge, D.C., C. Albanese, J.Y. Reuther, R.G. Pestell, and A.S. Baldwin, Jr. 1999. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*. 19:5785-99.
- Haan, K.M., W.W. Kwok, R. Longnecker, and P. Speck. 2000. Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor. *J Virol*. 74:2451-4.
- Hammerschmidt, W., and B. Sugden. 1989. Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature*. 340:393-7.
- Harnett, M.M. 2004. CD40: a growing cytoplasmic tale. *Sci STKE*. 2004:pe25.
- Hasbold, J., A.B. Lyons, M.R. Kehry, and P.D. Hodgkin. 1998. Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *Eur J Immunol*. 28:1040-51.

- Hatzivassiliou, E., W.E. Miller, N. Raab-Traub, E. Kieff, and G. Mosialos. 1998. A fusion of the EBV latent membrane protein-1 (LMP1) transmembrane domains to the CD40 cytoplasmic domain is similar to LMP1 in constitutive activation of epidermal growth factor receptor expression, nuclear factor-kappa B, and stress-activated protein kinase. *J Immunol.* 160:1116-21.
- Hauer, J., S. Puschner, P. Ramakrishnan, U. Simon, M. Bongers, C. Federle, and H. Engelmann. 2005. TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:2874-9.
- Henkel, T., P.D. Ling, S.D. Hayward, and M.G. Peterson. 1994. Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science.* 265:92-5.
- Hesslein, D.G., and D.G. Schatz. 2001. Factors and forces controlling V(D)J recombination. *Adv Immunol.* 78:169-232.
- Hinuma, Y., M. Konn, J. Yamaguchi, D.J. Wudarski, J.R. Blakeslee, Jr., and J.T. Grace, Jr. 1967. Immunofluorescence and herpes-type virus particles in the P3HR-1 Burkitt lymphoma cell line. *J Virol.* 1:1045-51.
- Hinz, M., D. Krappmann, A. Eichten, A. Heder, C. Scheidereit, and M. Strauss. 1999. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol.* 19:2690-8.
- Hofelmayr, H., L.J. Strobl, G. Marschall, G.W. Bornkamm, and U. Zimmer-Strobl. 2001. Activated Notch1 can transiently substitute for EBNA2 in the maintenance of proliferation of LMP1-expressing immortalized B cells. *J Virol.* 75:2033-40.
- Hollenbaugh, D., L.S. Grosmaire, C.D. Kullas, N.J. Chalupny, S. Braesch-Andersen, R.J. Noelle, I. Stamenkovic, J.A. Ledbetter, and A. Aruffo. 1992. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *Embo J.* 11:4313-21.
- Hsieh, J.J., S. Zhou, L. Chen, D.B. Young, and S.D. Hayward. 1999. CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:23-8.
- Huen, D.S., S.A. Henderson, D. Croom-Carter, and M. Rowe. 1995. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene.* 10:549-60.
- Ishida, T., N. Kobayashi, T. Tojo, S. Ishida, T. Yamamoto, and J. Inoue. 1995. CD40 signaling-mediated induction of Bcl-XL, Cdk4, and Cdk6. Implication of their cooperation in selective B cell growth. *J Immunol.* 155:5527-35.
- Izumi, K.M., E.D. Cahir McFarland, A.T. Ting, E.A. Riley, B. Seed, and E.D. Kieff. 1999. The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol.* 19:5759-67.
- Izumi, K.M., and E.D. Kieff. 1997. The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:12592-7.
- Jabara, H.H., S.M. Fu, R.S. Geha, and D. Vercelli. 1990. CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *J Exp Med.* 172:1861-4.

- Jacob, J., and G. Kelsoe. 1992. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periaarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med.* 176:679-87.
- Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., Vardiman J.W. 2001. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press,WHO classification of Tumours.,S 162-167.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walpot, M., Schlomchik., 2001. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, Garland Science Publishing, New York
- Jochner, N., D. Eick, U. Zimmer-Strobl, M. Pawlita, G.W. Bornkamm, and B. Kempkes. 1996. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 is a transcriptional suppressor of the immunoglobulin mu gene: implications for the expression of the translocated c-myc gene in Burkitt's lymphoma cells. *Embo J.* 15:375-82.
- Kaiser, C., G. Laux, D. Eick, N. Jochner, G.W. Bornkamm, and B. Kempkes. 1999. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol.* 73:4481-4.
- Kaneko, Y., S. Hirose, M. Abe, H. Yagita, K. Okumura, and T. Shirai. 1996. CD40-mediated stimulation of B1 and B2 cells: implication in autoantibody production in murine lupus. *Eur J Immunol.* 26:3061-5.
- Kang, M.S., H. Lu, T. Yasui, A. Sharpe, H. Warren, E. Cahir-McFarland, R. Bronson, S.C. Hung, and E. Kieff. 2005. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 does not induce lymphoma in transgenic FVB mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:820-5.
- Kantor, A.B., A.M. Stall, S. Adams, K. Watanabe, and L.A. Herzenberg. 1995. De novo development and self-replenishment of B cells. *Int Immunol.* 7:55-68.
- Kao, H.Y., P. Ordentlich, N. Koyano-Nakagawa, Z. Tang, M. Downes, C.R. Kintner, R.M. Evans, and T. Kadesch. 1998. A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev.* 12:2269-77.
- Kawabe, T., T. Naka, K. Yoshida, T. Tanaka, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, T. Kishimoto, and H. Kikutani. 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* 1:167-78.
- Kawanishi, H., and K. Joseph. 1991. IL4, IL5 and IL6-mediated regulation of immunoglobulin (Ig) heavy chain class switching and Ig production by gut-associated lymphoid tissue (GALT) B cells from athymic nude (nu/nu) mice. *Immunol Invest.* 20:605-21.
- Kempkes, B., D. Spitkovsky, P. Jansen-Durr, J.W. Ellwart, E. Kremmer, H.J. Delecluse, C. Rottenberger, G.W. Bornkamm, and W. Hammerschmidt. 1995. B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *Embo J.* 14:88-96.
- Kilger, E., A. Kieser, M. Baumann, and W. Hammerschmidt. 1998. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo J.* 17:1700-9.
- Kieff, E. and Rickinson, A.B. (2001). Epstein-Barr virus and its replication. In Virology. Vol.2. Edited by Fields BC, Knipe DM, Howley PM. New York: Lippincott-Raven Press. Fourth edition 2511-2573.
- Kindler, V., and R.H. Zubler. 1997. Memory, but not naive, peripheral blood B lymphocytes differentiate into Ig-secreting cells after CD40 ligation and costimulation with IL-4 and the differentiation factors IL-2, IL-10, and IL-3. *J Immunol.* 159:2085-90.
- Kitamura, D., A. Kudo, S. Schaal, W. Muller, F. Melchers, and K. Rajewsky. 1992. A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell.* 69:823-31.
- Kitamura, D., and K. Rajewsky. 1992. Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature.* 356:154-6.
- Knutson, J.C. 1990. The level of c-fgr RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J Virol.* 64:2530-6.

- Koschella, M., D. Voehringer, and H. Pircher. 2004. CD40 ligation in vivo induces bystander proliferation of memory phenotype CD8 T cells. *J Immunol.* 172:4804-11.
- Kosco, M.H., and D. Gray. 1992. Signals involved in germinal center reactions. *Immunol Rev.* 126:63-76.
- Kraus, M., M.B. Alimzhanov, N. Rajewsky, and K. Rajewsky. 2004. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell.* 117:787-800.
- Kroese, F.G., E.C. Butcher, A.M. Stall, P.A. Lalor, S. Adams, and L.A. Herzenberg. 1989. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int Immunol.* 1:75-84.
- Kudo, A., and F. Melchers. 1987. A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Embo J.* 6:2267-72.
- Kulwichit, W., R.H. Edwards, E.M. Davenport, J.F. Baskar, V. Godfrey, and N. Raab-Traub. 1998. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:11963-8.
- Kuo, T., and C. Hsueh. 1997. Lymphoepithelioma-like salivary gland carcinoma in Taiwan: a clinicopathological study of nine cases demonstrating a strong association with Epstein-Barr virus. *Histopathology.* 31:75-82.
- Kuppers, R., U. Klein, I. Schnering, V. Distler, A. Brauninger, G. Cattoretti, Y. Tu, G.A. Stolovitzky, A. Califano, M.L. Hansmann, and R. Dalla-Favera. 2003. Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest.* 111:529-37.
- Kuppers, R., K. Rajewsky, M. Zhao, G. Simons, R. Laumann, R. Fischer, and M.L. Hansmann. 1994. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:10962-6.
- Kuppers, R., I. Schnering, A. Brauninger, K. Rajewsky, and M.L. Hansmann. 2002. Biology of Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 13 Suppl 1:11-8.
- Kurth, J., T. Spieker, J. Wustrow, G.J. Strickler, L.M. Hansmann, K. Rajewsky, and R. Kuppers. 2000. EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity.* 13:485-95.
- Lai, E.C. 2002. Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Rep.* 3:840-5.
- Lam, N., and B. Sugden. 2003. CD40 and its viral mimic, LMP1: similar means to different ends. *Cell Signal.* 15:9-16.
- Leung, S.Y., L.P. Chung, S.T. Yuen, C.M. Ho, M.P. Wong, and S.Y. Chan. 1995. Lymphoepithelial carcinoma of the salivary gland: in situ detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Pathol.* 48:1022-7.
- Li, H.P., and Y.S. Chang. 2003. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J Biomed Sci.* 10:490-504.
- Ling, P.D., J.J. Ryon, and S.D. Hayward. 1993. EBNA-2 of herpesvirus papio diverges significantly from the type A and type B EBNA-2 proteins of Epstein-Barr virus but retains an efficient transactivation domain with a conserved hydrophobic motif. *J Virol.* 67:2990-3003.
- Liu, Y.J., O. de Bouteiller, and I. Fugier-Vivier. 1997. Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Curr Opin Immunol.* 9:256-62.
- Loder, F., B. Mutschler, R.J. Ray, C.J. Paige, P. Sideras, R. Torres, M.C. Lamers, and R. Carsetti. 1999. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med.* 190:75-89.

- Luftig, M., E. Prinarakis, T. Yasui, T. Tschritzis, E. Cahir-McFarland, J. Inoue, H. Nakano, T.W. Mak, W.C. Yeh, X. Li, S. Akira, N. Suzuki, S. Suzuki, G. Mosialos, and E. Kieff. 2003. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activation of NF-kappaB through IRAK1 and TRAF6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:15595-600.
- MacLennan, I.C., K.M. Toellner, A.F. Cunningham, K. Serre, D.M. Sze, E. Zuniga, M.C. Cook, and C.G. Vinuesa. 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev*. 194:8-18.
- Manolov, G., and Y. Manolova. 1972. Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas. *Nature*. 237:33-4.
- Martinez-Barnette, J., V. Madrid-Marina, R.A. Flavell, and J. Moreno. 2002. Does CD40 ligation induce B cell negative selection? *J Immunol*. 168:1042-9.
- McDonnell, T.J., N. Deane, F.M. Platt, G. Nunez, U. Jaeger, J.P. McKearn, and S.J. Korsmeyer. 1989. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*. 57:79-88.
- McHeyzer-Williams, M.G., and R. Ahmed. 1999. B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr Opin Immunol*. 11:172-9.
- Melchers, F., H. Karasuyama, D. Haasner, S. Bauer, A. Kudo, N. Sakaguchi, B. Jameson, and A. Rolink. 1993. The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today*. 14:60-8.
- Miller, G., J. Robinson, L. Heston, and M. Lipman. 1974. Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection, and interference. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 71:4006-10.
- Moorthy, R.K., and D.A. Thorley-Lawson. 1993. All three domains of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts. *J Virol*. 67:1638-46.
- Morse, H.C., 3rd, M.R. Anver, T.N. Fredrickson, D.C. Haines, A.W. Harris, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.C. Kogan, I.C. MacLennan, P.K. Pattengale, and J.M. Ward. 2002. Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice. *Blood*. 100:246-58.
- Mosialos, G. 2001. Cytokine signaling and Epstein-Barr virus-mediated cell transformation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 12:259-70.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, and T. Honjo. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 102:553-63.
- Muto, T., M. Muramatsu, M. Taniwaki, K. Kinoshita, and T. Honjo. 2000. Isolation, tissue distribution, and chromosomal localization of the human activation-induced cytidine deaminase (AID) gene. *Genomics*. 68:85-8.
- Nemerow, G.R., M.E. McNaughton, and N.R. Cooper. 1985. Binding of monoclonal antibody to the Epstein Barr virus (EBV)/CR2 receptor induces activation and differentiation of human B lymphocytes. *J Immunol*. 135:3068-73.
- Niedobitek, G., A. Agathangelou, H. Herbst, L. Whitehead, D.H. Wright, and L.S. Young. 1997. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol*. 182:151-9.
- Niedobitek, G., N. Meru, and H.J. Delecluse. 2001. Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J Exp Pathol*. 82:149-70.
- Niu, H. 2002. The proto-oncogene BCL-6 in normal and malignant B cell development. *Hematol Oncol*. 20:155-66.
- Notarangelo, L.D., M. Duse, and A.G. Ugazio. 1992. Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM). *Immunodef Rev*. 3:101-21.
- Nunez, G., L. London, D. Hockenbery, M. Alexander, J.P. McKearn, and S.J. Korsmeyer. 1990. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol*. 144:3602-10.

- Panagopoulos, D., P. Victoratos, M. Alexiou, G. Kollias, and G. Mosialos. 2004. Comparative analysis of signal transduction by CD40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1 in vivo. *J Virol.* 78:13253-61.
- Papavasiliou, F.N., and D.G. Schatz. 2002. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell.* 109 Suppl:S35-44.
- Parker, D.C. 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol.* 11:331-60.
- Pear, W.S., J.C. Aster, M.L. Scott, R.P. Hasserjian, B. Soffer, J. Sklar, and D. Baltimore. 1996. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med.* 183:2283-91.
- Peitsch, M.C., and C.V. Jongeneel. 1993. A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors. *Int Immunol.* 5:233-8.
- Pomerantz, J.L., and D. Baltimore. 2002. Two pathways to NF-kappaB. *Mol Cell.* 10:693-5.
- Pui, J.C., D. Allman, L. Xu, S. DeRocco, F.G. Karnell, S. Bakkour, J.Y. Lee, T. Kadesch, R.R. Hardy, J.C. Aster, and W.S. Pear. 1999. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity.* 11:299-308.
- Purtilo, D.T., C.K. Cassel, J.P. Yang, and R. Harper. 1975. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet.* 1:935-40.
- Radtke, F., A. Wilson, G. Stark, M. Bauer, J. van Meerwijk, H.R. MacDonald, and M. Aguet. 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity.* 10:547-58.
- Rajewsky, K. 1992. Early and late B-cell development in the mouse. *Curr Opin Immunol.* 4:171-6.
- Rajewsky, K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature.* 381:751-8.
- Ramesh, N., R. Fuleihan, and R. Geha. 1994. Molecular pathology of X-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM (HIGM1). *Immunol Rev.* 138:87-104.
- Rickert, R.C., J. Roes, and K. Rajewsky. 1997. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res.* 25:1317-8.
- Rickinson, A.B., and D.J. Moss. 1997. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol.* 15:405-31.
- Rickinson, A. B. and Kieff, E. (2001). Epstein-Barr virus. In Fields, B.N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanock, R.M., Melnick, J.L, Monath, T. Roizman, B. and Straus, s.E. (eds), *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA. Pp. 2575-2627
- Roberts, M.L., and N.R. Cooper. 1998. Activation of a ras-MAPK-dependent pathway by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for cellular transformation. *Virology.* 240:93-9.
- Rolink, A.G., J. Andersson, and F. Melchers. 1998. Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. *Eur J Immunol.* 28:3738-48.
- Rose, M.L., M.S. Birbeck, V.J. Wallis, J.A. Forrester, and A.J. Davies. 1980. Peanut lectin binding properties of germinal centres of mouse lymphoid tissue. *Nature.* 284:364-6.
- Rose, M.L., J.A. Habeshaw, R. Kennedy, J. Sloane, E. Wiltshaw, and A.J. Davies. 1981. Binding of peanut lectin to germinal-centre cells: a marker for B-cell subsets of follicular lymphoma? *Br J Cancer.* 44:68-74.
- Sambrook, J., Russel D.W. 2001. Molekular Cloning. Cole Spring Harbor laboratorie Press.
- Saito, T., S. Chiba, M. Ichikawa, A. Kunisato, T. Asai, K. Shimizu, T. Yamaguchi, G. Yamamoto, S. Seo, K. Kumano, E. Nakagami-Yamaguchi, Y. Hamada, S. Aizawa, and H. Hirai. 2003. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity.* 18:675-85.
- Sakaguchi, N., and F. Melchers. 1986. Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Nature.* 324:579-82.



- Sakai, T., Y. Taniguchi, K. Tamura, S. Minoguchi, T. Fukuhara, L.J. Strobl, U. Zimmer-Strobl, G.W. Bornkamm, and T. Honjo. 1998. Functional replacement of the intracellular region of the Notch1 receptor by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol.* 72:6034-9.
- Schauer, S.L., Z. Wang, G.E. Sonenshein, and T.L. Rothstein. 1996. Maintenance of nuclear factor-kappa B/Rel and c-myc expression during CD40 ligand rescue of WEHI 231 early B cells from receptor-mediated apoptosis through modulation of I kappa B proteins. *J Immunol.* 157:81-6.
- Seemayer, T.A., T.G. Gross, R.M. Egeler, S.J. Pirruccello, J.R. Davis, C.M. Kelly, M. Okano, A. Lanyi, and J. Sumegi. 1995. X-linked lymphoproliferative disease: twenty-five years after the discovery. *Pediatr Res.* 38:471-8.
- Siebelt, F., I. Berberich, G. Shu, E. Serfling, and E.A. Clark. 1997. Role for CD40-mediated activation of c-Rel and maintenance of c-myc RNA levels in mitigating anti-IgM-induced growth arrest. *Cell Immunol.* 181:13-22.
- Soriano, P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet.* 21:70-1.
- Speck, P., K.M. Haan, and R. Longnecker. 2000. Epstein-Barr virus entry into cells. *Virology.* 277:1-5.
- Stel, A.J., B.J. Kroesen, S. Jacobs, H. Groen, L.F. de Leij, H.C. Kluin-Nelemans, and S. Withoff. 2004. The role of B cell-mediated T cell costimulation in the efficacy of the T cell retargeting bispecific antibody BIS20x3. *J Immunol.* 173:6009-16.
- Strobl, L.J., H. Hofelmayr, G. Marschall, M. Brielmeier, G.W. Bornkamm, and U. Zimmer-Strobl. 2000. Activated Notch1 modulates gene expression in B cells similarly to Epstein-Barr viral nuclear antigen 2. *J Virol.* 74:1727-35.
- Stunz, L.L., L.K. Busch, M.E. Munroe, C.D. Sigmund, L.T. Tygrett, T.J. Waldschmidt, and G.A. Bishop. 2004. Expression of the cytoplasmic tail of LMP1 in mice induces hyperactivation of B lymphocytes and disordered lymphoid architecture. *Immunity.* 21:255-66.
- Sylla, B.S., S.C. Hung, D.M. Davidson, E. Hatzivassiliou, N.L. Malinin, D. Wallach, T.D. Gilmore, E. Kieff, and G. Mosialos. 1998. Epstein-Barr virus-transforming protein latent infection membrane protein 1 activates transcription factor NF-kappaB through a pathway that includes the NF-kappaB-inducing kinase and the IkappaB kinases IKKalpha and IKKbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:10106-11.
- Thomas, J.A., F. Cotter, A.M. Hanby, L.Q. Long, P.R. Morgan, B. Bramble, and B.M. Bailey. 1993. Epstein-Barr virus-related oral T-cell lymphoma associated with human immunodeficiency virus immunosuppression. *Blood.* 81:3350-6.
- Thorley-Lawson, D.A. 2001. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol.* 1:75-82.
- Tornell, J., S. Farzad, A. Espander-Jansson, G. Matejka, O. Isaksson, and L. Rymo. 1996. Expression of Epstein-Barr nuclear antigen 2 in kidney tubule cells induce tumors in transgenic mice. *Oncogene.* 12:1521-8.
- Tuscano, J.M., K.M. Druey, A. Riva, J. Pena, C.B. Thompson, and J.H. Kehrl. 1996. Bcl-x rather than Bcl-2 mediates CD40-dependent centrocyte survival in the germinal center. *Blood.* 88:1359-64.
- Uchida, J., T. Yasui, Y. Takaoka-Shichijo, M. Muraoka, W. Kulwichit, N. Raab-Traub, and H. Kikutani. 1999. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science.* 286:300-3.
- van Kooten, C., and J. Banchereau. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.* 67:2-17.
- Wang, D., D. Liebowitz, and E. Kieff. 1985. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell.* 43:831-40.

- Wang, F., C.D. Gregory, M. Rowe, A.B. Rickinson, D. Wang, M. Birkenbach, H. Kikutani, T. Kishimoto, and E. Kieff. 1987. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:3452-6.
- Wilson, J.B., J.L. Bell, and A.J. Levine. 1996. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *Embo J*. 15:3117-26.
- Xie, P., B.S. Hostager, and G.A. Bishop. 2004. Requirement for TRAF3 in signaling by LMP1 but not CD40 in B lymphocytes. *J Exp Med*. 199:661-71.
- Xu, J., T.M. Foy, J.D. Laman, E.A. Elliott, J.J. Dunn, T.J. Waldschmidt, J. Elsemore, R.J. Noelle, and R.A. Flavell. 1994. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity*. 1:423-31.
- Zimber-Strobl, U., B. Kempkes, G. Marschall, R. Zeidler, C. Van Kooten, J. Banchereau, G.W. Bornkamm, and W. Hammerschmidt. 1996. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) is not sufficient to maintain proliferation of B cells but both it and activated CD40 can prolong their survival. *Embo J*. 15:7070-8.
- Zimber-Strobl, U., and L.J. Strobl. 2001. EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin Cancer Biol*. 11:423-34.
- Zimber-Strobl, U., L.J. Strobl, C. Meitinger, R. Hinrichs, T. Sakai, T. Furukawa, T. Honjo, and G.W. Bornkamm. 1994. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of Drosophila Suppressor of Hairless. *Embo J*. 13:4973-82.

## Appendix 1

### Sequenz des *lmp1/cd40*-Targeting Vektors (TV Rosa26 LMP1/CD40)

```

1  ctacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac
61  cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcctttcgct ttcttccctt cctttctcgc
121  cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctcccttttag ggttccgatt
181  tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatgggt cacgtagtgg
241  gccatgcgcc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatat
301  tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt
361  ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt
421  taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgct tacaatttcc attcgccatt caggctgcgc
481  aactgttggg aagggcgatc ggtgcggggc tcttcgctat tacgccagct ggcgaaaggg
541  ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt tttcccagtc acgacgttgt
601  aaaacgacgg ccagtgcgcg cgcgtaatac gactcactat agggcggaatt ggagctccac
      Rosa 26 homologue Region >
661  cgcggcaggg cctccgagcg tgggtggagc gttctgtgag acagccgggt acgagtcgtg
      >.....Rosa 26 homologue Region.....>
721  acgctggaag gggcaagcgg gtggtgggca ggaatgcggt ccgccctgca gcaaccggag
      >.....Rosa 26 homologue Region.....>
781  ggggagggag aaggagcggg aaaagtctcc accggacgcg gccatggctc gggggggggg
      >.....Rosa 26 homologue Region.....>
841  gggcagcgga ggagcgcttc cggccgacgt ctgcgcgctg attggcttct tttcctcccg
      >.....Rosa 26 homologue Region.....>
901  ccgtgtgtga aaacacaaat ggcgtgtttt ggttggcgta aggcgcctgt cagttaacgg
      >.....Rosa 26 homologue Region.....>
961  cagccggagt gcgcagccgc cggcagcctc gctctgccc ctgggtgggg cgggaggtag
      >.....Rosa 26 homologue Region.....>
1021  gtggggtgag gcgagctgga cgtgcggggc cggtcggcct ctggcggggc gggggagggg
      >.....Rosa 26 homologue Region.....>
1081  agggagggtc agcgaaagta gctcgcgcgc gacggccgcc caccctcccc ttctctggg
      >.....Rosa 26 homologue Region.....>
1141  ggagtcgttt taccgcgcgc cggccggggc tcgtcgtctg attggctctc ggggccaga
      >.....Rosa 26 homologue Region.....>
1201  aaactggccc ttgccattgg ctgcgtttcg tgcaagttga gtccatccgc cggccagcgg
      >.....Rosa 26 homologue Region.....>
1261  gggcggcgag gaggcgctcc caggttccgg cctccccctc ggccccgcgc cgcagagtct
      >.....Rosa 26 homologue Region.....>
1321  ggccgcgcgc cctgcgcaa cgtggcagga agcgcgcgct gggggcgggg acgggcagta
      >.....Rosa 26 homologue Region.....>

```

## Appendix

```

1381  gggctgagcg gctgcggggc ggggtgcaagc acgtttccga cttgagttgc ctcaagaggg
>.....Rosa 26 homologe Region.....>

1441  gcgtgctgag ccagacctcc atcgcgcaact ccggggagtg gaggggaagga gcgagggctc
>.....Rosa 26 homologe Region.....>

1501  agttgggctg ttttggaggg aggaagcaact tgctctccca aagtcgctct gagttgttat
>.....Rosa 26 homologe Region.....>

1561  cagtaagggg gctgcagtgg agtaggcggg gagaaggccg cacccttctc cggagggggg
>.....Rosa 26 homologe Region.....>

1621  aggggagtg tgcataacct ttctgggagt tctctgctgc ctctggctt ctgaggaccg
>.....Rosa 26 homologe Region.....>

1681  ccctgggcct gggagaatcc cttccccctc ttccctcgtg atctgcaact ccagtctttc
>.....Rosa 26 homologe Region.....>>

1741  tagcatctgt agggcgcaagt agtccagggt ttccttgatg atgtcatact tatcctgtcc
SA >>>

1801  cttttttttc cacagctcgc ggttgaggac aaactcttcg cggctctttcc agtggttaat
>.....SA.....>>

1861  taaataactt cgtatagcat acattatacg aagttatgga tccaccatgg tgcgctcctc
>>.....loxP.....>>
>>....RFP.....>

1921  caagaacgtc atcaaggagt tcatgcgctt caaggcgccg atggagggca ccgtgaacgg
>.....RFP.....>

1981  ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc tacgagggcc acaacaccgt
>.....RFP.....>

2041  gaagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc tgggacatac tgtcgccgca
>.....RFP.....>

2101  attccaatac ggctccaagg tgtacgtgaa gcaccccgcc gacatccccg actacaagaa
>.....RFP.....>

2161  gctgtccttc cccgaggggt tcaagtggga gcgcgtgatg aacttcgagg acggcggcgt
>.....RFP.....>

2221  cgtgactgtg acccaagact cgtcactgca agacggctgc ttcacttaca aggtgaagtt
>.....RFP.....>

2281  catcggcgctg aacttcccct ccgacggccc cgtaatgcag aagaagacga tgggctggga
>.....RFP.....>

2341  ggctccacc gagcgctgtg acccccgcca cggcgtgctg aagggcgaga tccacaaggc
>.....RFP.....>

2401  cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc aagtccatct acatggccaa
>.....RFP.....>

2461  gaagcccgtg cagctgcccc gctactacta cgtggactcc aagctggaca tcacctccca
>.....RFP.....>

2521  caacgaggac tacaccatcg tggagcagta cgagcgcacc gagggccgcc accacctgtt
>.....RFP.....>

2581  cctgtagcgg ccgcggggat caattctcta gagctcgtcg atcagcctcg actgtgcctt
>.,RFP>>

```

## Appendix

```

>>.....bpA.....>
2641 ctagttgccca gccatctggt gtttgccctt cccccgtgcc ttccttgacc ctggaagggtg
>.....bpA.....>
2701 ccactcccac tgtcctttcc taataaaatg aggaaattgc atcgcatgtg ctgagtaggt
>.....bpA.....>
2761 gtcattctac tctgggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca
>.....bpA.....>
2821 atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggcttc tgaggcggaa agaaccagct
>.....bpA.....>
2881 ggggggatcc gcggccgctc gacgaagttc ctattccgaa gttcctattc tctagaaagt
>....bpA...>>
>>.....FRT.....>
2941 ataggaactt ctaccgggta ggggaggcgc ttttcccaag gcagtctgga gcatgcgctt
>...FRT...>>
>>.....PGKp.....>
3001 tagcagcccc gctgggcaact tggcgctaca caagtggcct ctggcctcgc acacattcca
>.....PGKp.....>
3061 catccaccgg taggcgcaa cgggtccgt tctttggtgg ccccttcgcg ccaccttcta
>.....PGKp.....>
3121 ctctcccct agtcaggaag ttcccccccg ccccgagct cgcgtcgtgc aggacgtgac
>.....PGKp.....>
3181 aaatggaagt agcacgtctc actagtctcg tgcagatgga cagcaccgct gagcaatgga
>.....PGKp.....>
3241 agcgggtagg cttttggggc agcggccaat agcagctttg ctcttcgct ttttgggctc
>.....PGKp.....>
3301 agaggctggg aaggggtggg tccggggcg ggctcagggg cgggctcagg ggcggggcgg
>.....PGKp.....>
3361 gcgcccgaag gtctccgga ggcccggcat tctgcacgt tcaaaagcgc acgtctgccg
>.....PGKp.....>
3421 cgctgttctc ctcttctca tctccgggcc tttcgaccaa ttcgctgtct gcgagggcca
>.....PGKp.....>>
3481 gctgttgggg tgagtactcc ctctcaaaag cgggcatgac ttctgcgcta agattgtcag
3541 tttccaaaaa cgaggaggat ttgatattca cctggcccgc ggtgatgcct ttgagggtgg
3601 ccgctccat ctggtcagaa aagacaatct tttgttgtc aagcttgagg tgtggcaggc
3661 ttgagatctg gccatacact tgagtgacaa tgacatccac tttgcctttc tctccacagg
3721 tgtccactcc caggtccaac tgcagccacc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt
>>.....neo.....>
3781 tctccggccg cttgggtgga gaggtatttc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc
>.....neo.....>
3841 tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag
>.....neo.....>

```

## Appendix

```
3901 accgacctgt cgggtgccct gaatgaactg caagacgagg cagcgcggct atcgtggctg
>.....neo.....>
3961 gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctgcacgttg tcaactgaagc gggaaaggac
>.....neo.....>
4021 tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc
>.....neo.....>
4081 gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc
>.....neo.....>
4141 tgccattcg accaccaagc gaaacatgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc
>.....neo.....>
4201 ggtcttgctg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg
>.....neo.....>
4261 ttcgccaggc tcaaggcgag catgcccagc ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat
>.....neo.....>
4321 gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc
>.....neo.....>
4381 cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctga tattgctgaa
>.....neo.....>
4441 gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat
>.....neo.....>
4501 tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagctct agagctcgtc
>.....neo.....>>
>>.....bpA.....>
4561 gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tccccgtgc
>.....bpA.....>
4621 cttccttgac cctggaaggc gccactccca ctgtcctttc ctaataaaaat gaggaaattg
>.....bpA.....>
4681 catcgcattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca
>.....bpA.....>>
4741 agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tctatggctt
4801 ctgaggcgga aagaaccagc tgggggaagt tcctattccg aagttcctat tctctagaaa
>>.....FRT.....>
4861 gtataggaac ttctcgacc tgcaggcggc cgcgaattca ctagtatta aagtcgactc
>....FRT....>>
Stop >>
4921 ggggacacca aatatggcga tctcggcctt ttcgtttctt ggagctggga catgtttgcc
>.....Stop.....>
4981 atcgatccat ctaccaccag aacggccgtt agatctgctg ccaccgttgt ttccaccgaa
>.....Stop.....>
5041 gaaaccaccg ttgccgtaac caccacgacg gttgttgcta aagaagctgc caccgccacg
>.....Stop.....>
5101 gccaccgttg tagccgcgtg tgttgttatt gtagttgctc atgttatttc tggcacttct
>.....Stop.....>
```

```

5161  tggttttcct cttaagtgag gaggaacata accattctcg ttgttgctgt tgatgcttaa
>.....Stop.....>
5221  attttgcaact tgttcgctca gttcagccat aatatgaaat gcttttcttg ttgttcttac
>.....Stop.....>
5281  ggaataccac ttgccaccta tcaccacaac taactttttc cgttcctcc atctctttta
>.....Stop.....>
5341  tatttttttt ctcgagggat ctttgtgaag gaaccttact tctgtggtgt gacataattg
>.....Stop.....>
5401  gacaaactac ctacagagat ttaaagctct aaggtaaata taaaattttt aagtgtataa
>.....Stop.....>
5461  tgtgttaaac tactgattct aattgtttgt gtattttaga ttccaaccta tggaactgat
>.....Stop.....>
5521  gaatgggagc agtgggtggaa tgcctttaat gaggaaaacc tgttttgctc agaagaaatg
>.....Stop.....>
5581  ccatctagtg atgatgaggc tactgctgac tctcaacatt ctactcctcc aaaaaagaag
>.....Stop.....>
5641  agaaaggtag aagaccccaa ggactttcct tcagaattgc taagtttttt gagtcatgct
>.....Stop.....>
5701  gtgttttagta atagaactct tgcttgcttt gctatttaca ccacaaagga aaaagctgca
>.....Stop.....>
5761  ctgctataca agaaaattat ggaaaaatat tctgtaacct ttataagtag gcataacagt
>.....Stop.....>
5821  tataatcata acatactggt ttttcttact ccacacaggc atagagtgtc tgctattaat
>.....Stop.....>
5881  aactatgctc aaaaattgtg taccttttagc tttttaattt gttaaaggggt taataaggaa
>.....Stop.....>
5941  tatttgatgt atagtgcctt gactagagat cataatcagc cataccacat ttgtagaggt
>.....Stop.....>
6001  ttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct cccctgaac ctgaaacata aaatgaatgc
>.....Stop.....>
6061  aattgttggt gttaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaaataaa gcaatagcat
>.....Stop.....>
6121  caciaatttc acaaataaag catttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact
>.....Stop.....>
6181  catcaatgta tcttatcatg tctggatctg acatggtaag taagcttata acttcgtata
>.....Stop.....>
>>...3loxP.....>
6241  gcatacatta tacgaagtta tcggcgcgcc gtttaaacgg atccgtgagg atggaacacg
>.....3loxP.....>
LMP1-CD40 >>.....>
6301  accttgagag gggcccaccg ggcccgcgac ggccccctcg aggaccccc ctctcctctt
>.....LMP1-CD40.....>

```

## Appendix

```

6361 ccctaggcct tgctctcctt ctctctctct tggcgctact gttttggctg tacatcgta
>.....LMP1-CD40.....>

6421 tgagtgactg gactggagga gccctccttg tctctatctt ctttgccttc atgcttataa
>.....LMP1-CD40.....>

6481 ttataatttt gatcatcttt atcttccgaa gagaccttct ctgtccactt ggagcccttt
>.....LMP1-CD40.....>

6541 gtatactcct actgatgatc accctcctgc tcctcgctct ctggaatttg cacggacagg
>.....LMP1-CD40.....>

6601 cattgttcct tgggaatttg ctgttcatct tcgggtgctt acttgtctta ggtatctgga
>.....LMP1-CD40.....>

6661 tctacttatt ggagatgctc tggcgacttg gtgccaccat ctggcagctt ttggccttct
>.....LMP1-CD40.....>

6721 tcctagcctt ctctctagac ctcatcctgc tcattattgc tctctatcta caacaaaact
>.....LMP1-CD40.....>

6781 ggtggactct attggttgat ctcttttggc tcctcctggt tctggcgatt ttaatctgga
>.....LMP1-CD40.....>

6841 tgtattacca tggacaacga aagaagccaa ccaataaggc ccccccacccc aagcaggaac
>.....LMP1-CD40.....>
>>.....CD40.....>

6901 cccaggagat caattttccc gacgatcttc ctggctccaa cactgctgct ccagtgcagg
>.....LMP1-CD40.....>
>.....CD40.....>

6961 agactttaca tggatgccaa ccggtcaccc aggaggatgg caaagagagt cgcctctcag
>.....LMP1-CD40.....>
>.....CD40.....>

7021 tgcaggagag acagtgaggc tgcaccacc caggagtgtg gccacgtggg caaacaggca
>.....LMP1-CD40.....>
>.....CD40.....>

7081 gttgtctaga ggatcataat cagccatacc acattttagt aggttttact tgctttaaaa
>..> LMP1-CD40
>..> CD40
>>.....'bpA.....>

7141 aacctccac acctccccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttggttaac
>.....'bpA.....>

7201 ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat
>.....'bpA.....>

7261 aaagcatttt ttctactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat
>.....'bpA.....>>

7321 catgtctgga tccggcgcg cgcgatatcgaa ttcgctagaa gatgggcggg agtcttctgg
L Arm' >
Rosa 26 homologe Region 2 >>.....>

7381 gcaggcttaa aggctaacct ggtgtgtggg cgttgtcctg caggggaatt gaacagggtg
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>

7441 aaaattggag ggacaagact tcccacagat ttccggtttt gtcgggaagt tttttaatag
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>

```



## Appendix

7501 gggcaaataa ggaaaatggg aggataggta gtcactctggg gttttatgca gcaaaactac  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

7561 aggttattat tgcttgtgat ccgcctcgga gtattttcca tcgaggtaga ttaaagacat  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

7621 gctcaccga gttttatact ctctgcttg agatccttac tacagtatga aattacagt  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

7681 tcgagagtta gactatgtaa gcagaatttt aatcattttt aaagagccca gtacttcata  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

7741 tccattttct ccgctccttc tgcagcctta tcaaaaggta ttttagaaca ctcatcttag  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

7801 cccatttttc atttattata ctggcttctc caacccttag acagagcatt ggcattttcc  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

7861 ctttcctgat cttagaagtc tgatgactca tgaaccaga cagattagtt acatacacca  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

7921 caaatcgagg ctgtagctgg ggcctcaaca ctgcagttct tttataactc cttagtacac  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

7981 tttttgttga tcctttgcct tgatccttaa ttttcagtgt ctatcacctc tcccgtcagg  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8041 tgggtgtcca catttgggcc tattctcagt ccaggagggt ttacaacaat agatgtattg  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8101 agaatccaac ctaaagctta actttccact cccatgaatg cctctctcct tttctccat  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8161 ttataaactg agctattaac cattaatggt ttccagggtg atgtctctc cccaatatt  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8221 acctgatgta tcttacatat tgccaggctg atattttaag acattaaaag gtatatttca  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8281 ttattgagcc acatggtatt gattactgct tactaaaatt ttgtcattgt acacatctgt  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8341 aaaagggtgt tccttttgga atgcaaagtt cagggtgttg ttgtctttcc tgacctagg  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8401 tcttgtgagc ttgtattttt tctattttaag cagtgtcttc tcttgactg gcttgactca  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8461 tggcattcta cacgttattg ctggtctaaa tgtgattttg ccaagcttct tcaggacct  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8521 taattttgct tgactttag ccaaacacaa gtaaatgat taagcaaca atgtatttgt  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8581 gaagcttggt ttttaggttg ttgtgtgtg tgtgcttggt ctctataata atactatcca  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8641 ggggctggag aggtggctcg gagttcaaga gcacagactg ctctccaga agtcctgagt  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8701 tcaattccca gcaaccacat ggtggctcac aaccatctgt aatgggatct gatgcctct  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8761 tctgggtgtgt ctgaagacca caagtgtatt cacattaaat aaataaatcc tccttcttct  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8821 tctttttttt ttttttaaag agaatactgt ctccagtaga atttactgaa gtaatgaaat  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8881 actttgtgtt tgttccaata tggtagccaa taatcaaatt actctttaag cactggaaat  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

8941 gttaccaagg aactaatttt tatttgaagt gtaactgtgg acagaggagc cataactgca  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9001 gacttgtggg atacagaaga ccaatgcaga ctttaatgtc ttttctctta cactaagcaa  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9061 taaagaaata aaaattgaac ttctagtatc ctatttgttt aaactgctag ctttacttaa  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9121 cttttgtgct tcatctatac aaagctgaaa gctaagtctg cagccattac taaacatgaa  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9181 agcaagtaat gataattttg gatttcaaaa atgtagggcc agagttagc cagccagtgg  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9241 tgggtgcttg ctttatgcct ttaatcccag cactctggag gcagagacag gcagatctct  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9301 gagtttgagc ccagcctggt ctacacatca agttctatct aggatagcca ggaatacaca  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9361 cagaaaccct gttggggagg ggggctctga gatttcataa aattataatt gaagcattcc  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9421 ctaatgagcc actatggatg tggctaaatc cgtctacctt tctgatgaga tttgggtatt  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9481 attttttctg tctctgctgt tggttgggtc ttttgacact gtgggctttc tttaaagcct  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9541 ccttctgcc atgtggtctc ttgtttgcta ctaacttccc atggcttaaa tggcatggct  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9601 ttttgccctc taagggcagc tgctgagatt tgcagcctga tttccagggt ggggttgga  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9661 aatctttcaa acactaaaat tgtcctttaa tttttttttt aaaaaatggg ttatataata  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9721 aacctcataa aatagttatg aggagtgagg tggactaata ttaaatgagt ccctccccta  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9781 taaaagagct attaaggctt tttgtcttat acttaacttt ttttttaa atgtgtatctt  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9841 tagaaccaag ggtcttagag ttttagtata cagaaactgt tgcacgctt aatcagattt  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9901 tctagtttca aatccagaga atccaaattc ttcacagcca aagtcaaatt aagaatttct  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

9961 gactttta atgttaatttgc ttactgtgaa tataaaaaatg atagcttttc ctgaggcagg  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10021 gtctcactat gtatctctgc ctgatctgca acaagatatg tagactaaag ttctgcctgc  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10081 ttttgtctcc tgaatactaa gggtaaaatg tagtaatact tttggaactt gcaggtcaga  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10141 ttcttttata ggggacacac taaggagct tgggtgatag ttggtaaaat gtgtttcaag  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10201 tgatgaaaac ttgaattatt atcacgcgaa cctacttttt aaaaaaaaaa gccaggcctg  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10261 ttagagcatg cttaagggat ccctaggact tgctgagcac acaagagtag ttacttggca  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10321 ggctcctggt gagagcatat ttcaaaaaac aaggcagaca accaagaaac tacagttaag  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10381 gttacctgtc tttaaaccat ctgcatatac acagggatat taaaatattc caaataatat  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10441 ttcattcaag ttttccccca tcaaattggg acatggattt ctccggtgaa taggcagagt  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10501 tggaaactaa acaaatgttg gttttgtgat ttgtgaaatt gttttcaagt gatagttaaa  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10561 gcccatgaga tacagaacaa agctgctatt tcgaggctctc ttggtttata ctcagaagca  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10621 cttcttttggg tttccctgca ctatcctgat catgtgctag gcctacctta ggctgattgt  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10681 tgttcaaata aacttaagtt tcctgtcagg tgatgtcata tgatttcata tatcaaggca  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10741 aaacatgtta tatatgttaa acatttgtac ttaatgtgaa agttaggtct ttgtgggttt  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10801 gatttttaat tttcaaaacc tgagctaaat aagtcatttt tacatgtctt acatttgggtg  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10861 gaattgtata attgtgggtt gcaggcaaga ctctctgacc tagtaaccct acctatagag  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10921 cactttgctg ggtcacaagt ctaggagtca agcatttcac cttgaagttg agacgttttg  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

10981 ttagtgata ctagtttata tgttggagga catgtttatc cagaagatat tcaggactat  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

11041 ttttgactgg gctaaggaat tgattctgat tagcactgtt agtgagcatt gagtggcctt  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

11101 taggcttgaa ttggagtcac ttgtatatct caaataatgc tggccttttt taaaaagccc  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

11161 ttgttcttta tcaccctgtt ttctacataa tttttgttca aagaaatact tgtttggatc  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

11221 tccttttgac aacaatagca tgttttcaag ccatattttt tttccttttt tttttttttt  
>.....Rosa 26 homologue Region 2.....>

## Appendix

11281 ttggtttttc gagacagggg ttctctgtat agccctggct gtcctggaac tcactttgta  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>

11341 gaccaggctg gcctcgaact cagaaatccg cctgcctctg cctcctgagt gccgggatta  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>

11401 aaggcgtgca ccaccacgcc tggctaagtt ggatattttg ttatataact ataaccaata  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>

11461 ctaactccac tgggtggatt ttttaattcag tcagtagtct taagtggctt ttattggccc  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>

11521 ttcattaaaa tctactgttc actctaacag aggctgttgg tactagtggc acttaagcaa  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>

11581 cttcctacgg atatactagc agattaaggg tcagggatag aaactagtct agcgttttgt  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>

11641 atacctacca gctttatact accttgttct gatagaaata tttcaggaca tctagcttat  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>

11701 cgataccgac gacggtatcg ataagcttga tatcgaattc taccgggtag gggaggcgct  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>  
>>.....pA.....>

11761 tttcccaagg cagtctggag catgcgcttt agcagccccg ctgggcactt ggcgctacac  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>  
>.....pA.....>

11821 aagtggcttc tggcctcgca cacattccac atccaccggg aggcgccaac cggctccgtt  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>  
>.....pA.....>

11881 ctttgggtggc cccttcgcgc caccttctac tcctccccta gtcaggaagt tccccccgc  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>  
>.....pA.....>

11941 cccgcagctc gcgtcgtgca ggacgtgaca aatggaagta gcacgtctca ctagtctcgt  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>  
>.....pA.....>

12001 gcagatggac agcaccgctg agcaatggaa gcgggtaggc ctttggggca gcggccaata  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>  
>.....pA.....>

12061 gcagctttgc tccttcgctt tctgggctca gaggctggga aggggtgggt ccgggggcgg  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>  
>.....pA.....>

12121 gctcaggggc gggctcaggg gcggggcggg cgcccgaagg tcctccggag gcccggcatt  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>  
>.....pA.....>

12181 ctgcacgctt caaaagcgca cgtctgccgc gctgttctcc tcttctcat ctccgggcct  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>  
>.....pA.....>

12241 ttcgacctgc aggtcctcgc catggatcct gatgatgttg ttgattcttc taaatctttt  
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>  
>.....pA.....>>

12301 gtgatggaaa acttttcttc gtaccacggg actaaacctg gttatgtaga ttccattcaa

## Appendix

```

>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>
12361 aaaggtatac aaaagccaaa atctggtaca caaggaaatt atgacgatga ttggaaaggg
>.....Rosa 26 homologe Region 2.....>
12421 ttttatagta ccgacaataa atacgacgct gcgggatact ctgtagataa tgaaaacccg
>.....>> Rosa 26 homologe Region 2
12481 ctctctggaa aagctggagg cgtggtcaaa gtgacgtatc caggactgac gaaggttctc
12541 gcactaaaag tggataatgc cgaaactatt aagaaagagt taggtttaag tctcactgaa
12601 ccgttgatgg agcaagtcgg aacggaagag tttatcaaaa gggtcgggtga tgggtgcttcg
12661 cgtgtagtgc tcagccttcc cttcgctgag gggagttcta gcgttgaata tattaataac
12721 tgggaacagg cgaaagcgtt aagcgtagaa cttgagatta attttgaaac ccgtggaaaa
12781 cgtggccaag atgcgatgta tgagtatatg gctcaagcct gtgcaggaaa tcgtgtcagg
12841 cgatctcttt gtgaaggaac cttacttctg tgggtgtgaca taattggaca aactacctac
12901 agagatttaa agctctaagg taaatataaa atttttaagt gtataatgtg ttaaactact
>>.....SVpA.....>
12961 gattctaatt gtttgtgtat tttagattcc aacctatgga actgatgaat gggagcagtg
>.....SVpA.....>
13021 gtggaatgca gatcctagag ctcgctgac agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc
>.....SVpA.....>
13081 atctgttggt tgcccctccc ccgtgccttc cttgaccctg gaagggtgcca ctcccactgt
>.....SVpA.....>
13141 cctttcctaa taaaatgagg aaattgcac gcattgtctg agtaggtgtc attctattct
>.....SVpA.....>
13201 ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc
>.....SVpA.....>
13261 tggggatgcg gtgggctcta tggcttctga ggcggaaaga accagctggg gctcgagggg
>.....SVpA.....>>
13321 gggcccggta cccagctttt gttcccttta gtgagggtta attgcgcgct tggcgtaatc
13381 atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg
13441 agccggaagc ataaagtgta aagcctgggg tgccaatga gtgagctaac tcacattaat
13501 tgcgttgcg cactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg
13561 aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct
13621 cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc
13681 ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg
13741 ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg
>>....ori.....>
13801 ccccttgac gagcatcaca aaaatcgac ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg
>.....ori.....>

```

## Appendix

13861 actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgtttccgac  
>.....ori.....>

13921 cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca  
>.....ori.....>

13981 tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt  
>.....ori.....>

14041 gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc  
>.....ori.....>

14101 caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag  
>.....ori.....>

14161 agcgaggtat gtaggcgggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac  
>.....ori.....>

14221 tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt  
>.....ori.....>

14281 tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa  
>.....ori.....>

14341 gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg  
>.....ori.....>>

14401 gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggatcatga gattatcaaa

14461 aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat

14521 atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc

14581 gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat

14641 acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc

14701 ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggtcc

14761 tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattggtgc cgggaagcta gagtaagtag

14821 ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgtcacg

14881 ctcgctggtt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg

14941 atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctcccttcggg cctccgatcg ttgtcagaag

15001 taagttggcc gcagtgttat cactcatggg tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt

15061 catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga

15121 atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgctc atacgggata ataccgcgcc

15181 acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc

15241 aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgac

15301 ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc

15361 cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca

15421 atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat

## Appendix

---

15481 ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cac

## Appendix2

Sequenz des *ebna2* Gens das über die *AscI* Schnittstelen in Appendix 1 beschriebenen Targeting Vektor eingefügt wurde. (EBNA2 Kassette)

```

1  cgcgccggtt aaaccacccg cgcttgtgtt ttgctttatc tgccgccatc atgcctacat
    >>EBNA2..>

61  tctatcttgc gttacatggg ggacaaacat atcatcctaat tgttgacacg gatagtcttg
    >.....EBNA2.....>

121 gaaaccggtc actctcagta attccctcga atccctacca ggaacaactg tcagacactc
    >.....EBNA2.....>

181 cattaattcc actaacaatc ttgtttgggg aaaacacggg ggtgccccca cactccccc
    >.....EBNA2.....>

241 cccccccccc accaccaccc ccaccacccc caccaccccc accaccacca ccacccccac
    >.....EBNA2.....>

301 cacctccacc accttcacca ccacccccgc cccaccacc cccaccacct cagcgcaggg
    >.....EBNA2.....>

361 atgcctggac acaagagcca tcacctcttg atagggatcc gctaggatat gacgtcgggc
    >.....EBNA2.....>

421 atggacctct agcatctgct atgcgaatgc ttgggatggc taattatatt gtaagacaat
    >.....EBNA2.....>

481 cagggggtga cgggggcctt attttgccac aaggcccaca aacagcccct caggccaggt
    >.....EBNA2.....>

541 tgggtccagcc acatgtcccc cctctacgcc cgacagcacc caccattttg tcacctctgt
    >.....EBNA2.....>

601 cacaaccgag gcttaccctt ccacaaccac tcatgatgcc accaaggcct acccctccta
    >.....EBNA2.....>

661 cccctctgcc acctgcaaca ctaacgggtg caccaaggcc taccggtcct accactctgc
    >.....EBNA2.....>

721 caccacaccc actactcacg gtactacaaa ggccctaccga acttcaaccc acaccatcac
    >.....EBNA2.....>

781 caccacgcat gcctctccct gtcttgcatg tgccagacca atcaatgcac cctcttactc
    >.....EBNA2.....>

841 atcaaagcac cccaatgat ccagatagtc cagaaccacg gtccccgact gtattttata
    >.....EBNA2.....>

901 acattccacc tatgccatta ccccccctac aattgccacc accagcagca ccagcacagc
    >.....EBNA2.....>

961 cacctccagg ggtcatcaac gaccaacaat tacatcatct accctcgggg ccaccatggt
    >.....EBNA2.....>

1021 ggccacccat ctgcgacccc ccgcaaccct ctaagactca aggccagagc cggggacaga
    >.....EBNA2.....>

1081 gcaggggggag gggcaggggc aggggcaggg gcagggggcaa gggcaagtcc agggacaagc

```



## Appendix

```
>.....EBNA2.....>
1141 aacgcaagcc cgggtggacct tggagaccag agccaaacac ctccagtcct agcatgcctg
>.....EBNA2.....>
1201 aactaagtcc agtcctcggc cttcatcagg gacaaggggc tggggactca ccaactcctg
>.....EBNA2.....>
1261 gcccatccaa tgccgcccc gtttgtagaa attcacacac ggcaaccctt aacgtttcac
>.....EBNA2.....>
1321 caatacatga accggagtcc cataatagcc cagaggctcc cattctcttc cccgatgatt
>.....EBNA2.....>
1381 ggtatcctcc atctatagac cccgcagact tagacgaaag ttgggattac atttttgaga
>.....EBNA2.....>
1441 caacagaatc tcctagctca gatgaagatt atgtggaggg atccagtaaa agacctcgcc
>.....EBNA2.....>
1501 cctccatcca gtaaaaaccc ttgccctctc cagcaaccaa tgtctagagg atcataatca
>....EBNA2...>>
>>.....'bpA.....>
1561 gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga
>.....'bpA.....>
1621 acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg
>.....'bpA.....>
1681 gttacaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt
>.....'bpA.....>
1741 ctagttgtgg ttgttccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc cgg
>.....'bpA.....>>
```

Teile dieser Arbeit wurden bisher wie folgt öffentlich präsentiert:

Poster: FEBS International Summer School of Immunology; Sept. 2004

Cornelia Hoemig, Julia Rastelli, Stefano Casola, Klaus Rajewsky, Werner Müller, Ursula Zimmer-Strobl

**Constitutive CD40 signalling blocks Germinal Center (GC) formation.**

Poster: International EBV Sept.2004

Cornelia Hoemig, Julia Rastelli, Stefano Casola, Klaus Rajewsky, Werner Müller, Ursula Zimmer-Strobl

**Generation and characterisation of transgenic mice expressing a fusion protein containing the transmembrane domain of LMP1 and the signalling domain of CD40.**

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in Vorbereitung zur Veröffentlichung:

Cornelia Hoemig, Julia Rastelli, Werner Müller, Stefano Casola, Jürgen Ruland, Andreas Gewies, Letitia Quintanilla-Fend, Klaus Rajewsky, Ursula Zimmer-Strobl;

**Constitutiv CD40 Signalling leads to tumor-development and activates the non-canonical signalling pathway.**

Manuskript in Vorbereitung

## Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen Personen herzlich, die mir diese Arbeit ermöglicht und zu deren Gelingen beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof.Dr.Dirk Eick für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft, die verantwortliche Betreuung dieser Promotion an der LMU-München zu übernehmen, außerdem Herrn Prof.Dr. Georg Bornkamm, das er es mir ermöglicht hat, am Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik der GSF zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Ursula Strobl für die hervorragende Betreuung, insbesondere für die Einweisung in alle Bereiche des Laboralltags, die ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung sowie für ihre humorvolle und offene Begleitung.

Dr. Jürgen Ruland und Dr. Andreas Gewies möchte ich dafür danken, dass sie mich in die höhere Kunst der „Elektro mobility shift Assays“ aus primären B-Zellen eingeführt haben, sowie Prof.Dr. Werner Müller und Dr. Martin Hafner für schnelle und unkomplizierte Generierung der Chimären. Auch danke ich Frau. Quintaniella Fend für die von ihr durchgeführte diagnostische Arbeit an den Tumormäusen

Herzlich Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Mitstreitern im Labor, Hella Kohlhof, Julia Rastelli, Caroline Hojer, Gabriele Marschall und Lothar Strobl, für die fachliche und persönliche Unterstützung. Durch ihre Hilfsbereitschaft und ihre oft sehr zuckerlastigen Aufmunterungen, haben sie mir die Lösung so manchen Problems sehr erleichtert.

Vielen Dank auch an Maren Mierau, Florian Rückerl, Stefanie Tobolik, Berit Jungnickel, Nathalie Uttersprot und allen anderen MitarbeiternInnen des Institutes für die stetige Hilfsbereitschaft und ihr Offenes Ohr bei vielen kleinen Fragen.

Ich möchte auch allen Mitgliedern des „Lunch-Clubs“ danken für die vielen kulinarischen Genüsse, auf die ich mich einmal in der Woche freuen durfte.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben. Ohne das Vertrauen, dass sie mir entgegen gebracht haben, und die stetige Unterstützung meiner Entscheidungen hätte ich diese Arbeit kaum durchführen können.

Ihnen sowie meinen Schwestern Barbara und Regine sowie Michael Hölzel danke ich auch für die moralische Unterstützung, für so manchen Rat und viele aufmunternde Worte.

## Lebenslauf

Name	Cornelia Hömig
Geburtsdatum	16.02.1977
Geburtsort	Köln
Nationalität	Deutsch
Lebenslauf: 1983-1987	Katholische Grundschule Erlenweg, Köln Bickendorf
1987-1996	Städtisches Apostelgymnasium, Köln Lindenthal
1996-2001	Studium der Biologie an der Universität zu Köln, Abschluss: Diplom der Biologie Note: sehr gut Titel der Diplomarbeit: „Insertion des Epstein-Barr-Virus-kodierten Gens Imp1 in den rosa26 Lokus der Maus zur Cre-abhängigen konditionalen Expression“ Betreuer der Diplomarbeit: Prof. Dr. Klaus Rajewsky
2000	Zweimonatiger Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. Dr. Philip W.Ingham, Krebs Institut of the University of Sheffield, England. Bearbeitetes Thema: Charakterisierung der Zebrafisch-Mutante „Chameleon“ sowie des Einflusses der Hedhog-Signalkaskade auf die Entwicklung von Motorneuronen im Zebrafisch.
2002-2005	Promotion am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik Titel der Doktorarbeit: „Einfluss der Epstein-Barr-Virus Proteine LMP1 und EBNA2 auf die B-Zellentwicklung <i>in vivo</i> “ Betreuer: Prof. Dr. Dirk Eick u. PD. Dr. Ursula Strobl